



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio del gen *AGAMOUS-like 19 (AGL19)* en el
desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

MINELY CERÓN BUSTAMANTE



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MA. DE LA PAZ SÁNCHEZ JIMÉNEZ

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Estudio del gen AGAMOUS-like 19 (AGL19) en el desarrollo de la raíz de Arabidopsis thaliana.

realizado por **Cerón Bustamante Minely** con número de cuenta **3-0504604-6** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Víctor Manuel Valdés López

Propietario Dra. Alicia Gamboa de Buen

Propietario Dra. Ma. De la Paz Sánchez Jiménez
Tutora

Suplente Dra. Aurora Zlotnik Espinosa

Suplente M. en C. Rigoberto Vicencio Pérez Ruiz

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 07 de noviembre de 2012
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/mdm

Agradecimientos

A los miembros del comité tutor:

Dra. Ma. De la Paz Sánchez Jiménez por las enseñanzas técnicas y teóricas así como el apoyo extra-académico que constantemente me ofreció durante la realización de esta tesis.

Dra. Alicia Gamboa de Buen por todas las aportaciones realizadas a este trabajo, por su confianza y los tantos consejos acertados.

Dra. Aurora Zlotnik Espinosa y al Dr. Victor Manuel Váldez López por todas las sugerencias que enriquecieron esta tesis.

Al M. en C. Rigoberto Vicencio Pérez Ruiz por todas las aclaraciones, así como por su apoyo técnico en la realización de esta tesis.

También agradezco a la Dra. Erica Duarte Silveira por todas las enseñanzas teóricas y prácticas sin las cuales no hubiera sido posible la realización de este trabajo. A la Biol. Karla Veronica García-Cruz y el M. en C. David Cruz Sánchez por su apoyo técnico y por sus constantes enseñanzas prácticas y apoyo extra-académico que hizo posible la culminación de esta tesis, así como a la Dra. Ana Paola Rojas Meza por las constantes ideas y sugerencias brindadas.

Por el apoyo técnico y académico a las Dras. Elena Alvarez-Buylla Roces Adriana Garay Arroyo y Berenice García Ponce de León.

A Diana Romo Ríos por su constante apoyo administrativo.

Este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos de investigación:

UNAM, PAPIIT: IB201212; IN204011-3; IN229009-3; IN226510-3; IN204011-3, IN229009-3
CONACYT: 152649; 81542; 81433; 167705; 105678; 180098; 180380.

Red Temática de Investigación CONACYT: "Complejidad, Ciencia y Sociedad" 124909. UC-MEXUS CN 12-623.

Índice

Agradecimientos	II
Índice	III
Abreviaturas	V
Resumen	VI
1. Introducción	1
1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo experimental.....	1
1.2 Estructura y desarrollo de la raíz.....	2
1.3 Factores de transcripción tipo MADS-box en plantas	4
1.4 Función de <i>AGL19</i> en el desarrollo de la raíz	8
1.5 Métodos de estudio para la determinación del patrón de expresión génica.....	11
1.6 Hibridación <i>in situ</i> “whole mount “ (WISH).....	14
1.7 WISH en tejidos de plantas.....	15
2. Antecedentes inmediatos	16
3. Planteamiento del problema	18
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivos	19
6. Método experimental	20
6.1 Material biológico y condiciones de crecimiento	20
6.2 Extracción de ARN y RT-PCR	20
6.3 Hibridación <i>in situ</i> “whole mount”	21
6.3.1 Preparación de la sonda	21
6.3.2 Fijación del tejido.....	23
6.3.3 Permeabilización e hibridación.....	23
6.3.4 Lavados de las muestras.....	24
6.3.5 Detección de la sonda	24
7. Resultados.....	26
7.1 Estandarización de la técnica de WISH para la localización de transcritos en la raíz.....	26

7.1.1	La fijación del tejido, la concentración y tiempo de incubación del anticuerpo fueron los puntos determinantes para la estandarización de la técnica de WISH	26
7.2	Análisis de expresión del gen <i>AGL19</i> y <i>XAL2/AGL14</i> en la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> ...	34
7.2.1	La expresión de <i>AGL19</i> y <i>XAL2/AGL14</i> incrementa con el tiempo de desarrollo de la raíz.....	34
7.2.2	El mutante <i>agl19-3</i> y <i>xal2-2</i> son controles útiles para determinar la expresión de <i>AGL19</i> en la raíz.	35
7.3	Patrón de expresión espacio-temporal del gen <i>AGL19</i> en la raíz	36
7.3.1	La sonda de ARNm para <i>AGL19</i> fue diseñada en la región con menor similitud a la secuencia de <i>XAL2/AGL14</i>	36
7.3.2	El producto generado por transcripción <i>in vitro</i> corresponde a la sonda de ARNm de <i>AGL19</i>	39
7.3.3	La expresión del mensajero <i>AGL19</i> muestra un patrón diferencial a lo largo del eje apico-basal de la raíz de plantas silvestres.	40
7.3.4	La señal de expresión en los mutantes <i>agl19-3</i> y <i>xal2-2</i> complementa el patrón de expresión observado en plantas silvestres.	45
8.	Discusión	47
8.1	Estandarización de la técnica de WISH para la localización de transcritos en raíz	47
8.2	Patrón de expresión espacio-temporal de <i>AGL19</i>	49
8.3	Patrón de expresión y función de <i>AGL19</i>	51
9.	Conclusiones	52
10.	Perspectivas	53
11.	Anexo.....	54
12.	Referencias.....	58

Abreviaturas

ADN *Ácido desoxirribonucleico*

AGL17 *AGAMOUS-like 17*

AGL19 *AGAMOUS-like 19*

AP *Fosfatasa alcalina*

ARN *Ácido ribonucleico*

ARNm *Ácido ribonucleico mensajero*

BCIP *5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato*

DIG *Digoxigenina*

DMSO *Dimetilsulfóxido*

DNasa *Desoxirribonucleasa*

DTT *Ditiotreitol*

EDTA *Ácido etileno diaminotretacético*

MTSB *Amortiguador estabilizante de microtúbulos*

NaAC *Acetato de sodio*

NTB *4-cloruro de nitroazul de tetrazolio*

PBS *Amortiguador de fosfato salino*

PBT *Amortiguador de fosfato salino y Tween[®] -20*

PCR *Reacción en cadena de la polimerasa*

PFA *Paraformaldheído*

RNasa *Ribonucleasa*

RT-PCR *Reacción en cadena de la polimerasa reversa transcriptasa*

T-ADN *Ácido desoxirribonucleico de transferencia*

UTP *Uracilo trifosfato*

WISH *Hibridación in situ "whole mount"*

XAL1/AGL12 XAANTAL1/AGAMOUS-like 12

XAL2/AGL14 XAANTAL2/AGAMOUS-like 14

Resumen

Arabidopsis thaliana es una Brassicacea ampliamente utilizada como modelo experimental en estudios fisiológicos, genéticos y de biología molecular en plantas. En particular, su raíz presenta una simplicidad anatómica, tamaño pequeño y transparencia que permiten estudiar con relativa facilidad los diferentes tipos celulares que la componen. Tales características han permitido estudiar los procesos de proliferación y diferenciación celular, necesarios para la organogénesis en plantas. El balance entre ambos procesos involucra una expresión génica diferencial finamente regulada por numerosos factores, entre los que destacan los factores de transcripción. Analizar su patrón de expresión durante el desarrollo es prioridad para su caracterización funcional. Para ello la técnica de hibridación *in situ* es una de las técnicas más utilizadas.

En el presente trabajo se estandarizó la técnica de hibridación *in situ* "whole mount" (WISH) para el análisis de expresión del gen *AGAMOUS-like 19 (AGL19)*, un gen perteneciente a la familia de factores de transcripción tipo MADS, durante el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.

Para ello, se modificaron numerosos puntos del protocolo de hibridación *in situ* publicado por Hejátko *et al.*, (2006), entre los que destacan: la fijación química, la concentración de la sonda, el número de lavados, la concentración y tiempo de incubación del anticuerpo. Tales cambios realizados en este trabajo mejoraron de forma sustancial los problemas de señal inespecífica y maltrato al tejido de raíz.

Así mismo, se analizó la expresión del gen *AGL19* en raíces de plantas de 7 días post siembra (dps), logrando determinar una expresión diferencial a lo largo del eje apico-basal de la raíz. La señal de expresión fue observada en células del córtex, y haz vascular de la zona meristemática y todos los tipos celulares (epidermis, córtex, y haz vascular) de la zona de elongación.

Dado que el gen *AGL19* comparte una gran identidad (80% de identidad a nivel de su secuencia codificante) con el gen *XAL2/AGL14*, así como una fuerte expresión en raíz

(Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b; Rounsley *et al.*, 1995); se realizó la localización del transcrito de *AGL19* en plantas mutantes de *XAL2/AGL14*, lo que corroboró el patrón de expresión de *AGL19*.

Estos resultados contribuyen a la caracterización funcional de *AGL19* en el desarrollo radicular.

1. Introducción

1.1 *Arabidopsis thaliana* como modelo experimental.

Con la finalidad de identificar los genes que controlan el desarrollo en plantas, se han designado distintos organismos modelo, entre los que destaca la pequeña eudicotiledónea *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis thaliana es una Brassicacea ampliamente utilizada como modelo experimental en estudios fisiológicos, genéticos y de biología molecular en plantas, debido a que ofrece múltiples beneficios para su estudio, como un ciclo de vida corto (cerca de seis semanas desde la germinación hasta la maduración de las semillas), abundante producción de semillas, un genoma relativamente pequeño (de alrededor de 125 Mb) que está completamente secuenciado, obtención de mutantes mediante métodos eficientes de transformación genética y un gran número de líneas mutantes, muchas de las cuales se encuentran disponibles en centros de distribución de semillas (Koornnef *et al.*, 2004).

El ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana* es similar al observado en cualquier otra angiosperma. La doble fecundación produce un embrión cuya organización celular define dos meristemas primarios; el meristemo apical de raíz (Root Apical Meristem, RAM) y el meristemo apical aéreo (Shoot Apical Meristem, SAM), los cuales mantienen la organogénesis durante toda la vida de la planta.

Posterior a la germinación, el SAM dirige la formación de hojas en roseta. Este desarrollo vegetativo culmina con la transición a la floración, que promueve la emergencia de un escapo en cuyos extremos axilares se desarrollan flores perfectas, con capacidad de autofecundarse. Por otra parte, el RAM controla el desarrollo de la raíz, el cual no se ve alterado desde la formación de la raíz primaria originada en la embriogénesis, su crecimiento es continuo y sigue un mismo patrón de diferenciación radial (Taiz & Zeiger 2006).

1.2 Estructura y desarrollo de la raíz

En particular, la raíz de *Arabidopsis thaliana* presenta una simplicidad anatómica, tamaño pequeño y transparencia que permiten estudiar con relativa facilidad los diferentes tipos celulares que la componen. Funcionalmente, se ha dividido en tres regiones contiguas, caracterizadas por los distintos procesos celulares que en ellas se llevan a cabo (Figura 1.A).

La zona meristemática o región proliferativa que conforma el RAM, es caracterizada por una gran actividad mitótica celular; aquí se localiza un número pequeño de células troncales que generan todos los tipos celulares de la raíz. Este nicho de células troncales está conformado por cuatro células centrales con baja actividad mitótica conocidas como centro quiescente, a partir de las cuales se generan las células iniciales de la columela, epidermis/cofia lateral, córtex/endodermis y haz vascular/periciclo (Figura 1.B y 1.C), que a su vez generan nuevas células sin comprometer su estado celular indiferenciado, resultado de un proceso de señalización entre éstas y el centro quiescente (Aida *et al.*, 2004; van den Berg *et al.*, 1997).

Cuando las células emergen de la zona meristemática, experimentan un periodo de crecimiento o alargamiento celular definiendo la zona de elongación. Finalmente, las células comienzan a diferenciarse y con ello es evidente la aparición de pelos radiculares y células vasculares desarrolladas, caracterizando la zona de diferenciación.

Cada una de estas zonas de la raíz se encuentran acopladas tridimensionalmente con un patrón radial de diferenciación tisular. En un corte transversal a nivel de la zona de diferenciación, es posible apreciar una serie de capas celulares dispuestas en forma de anillos concéntricos que están definidos de afuera hacia adentro como epidermis, córtex, endodermis y haz vascular constituidos por el periciclo, protoxilema y protofloema.

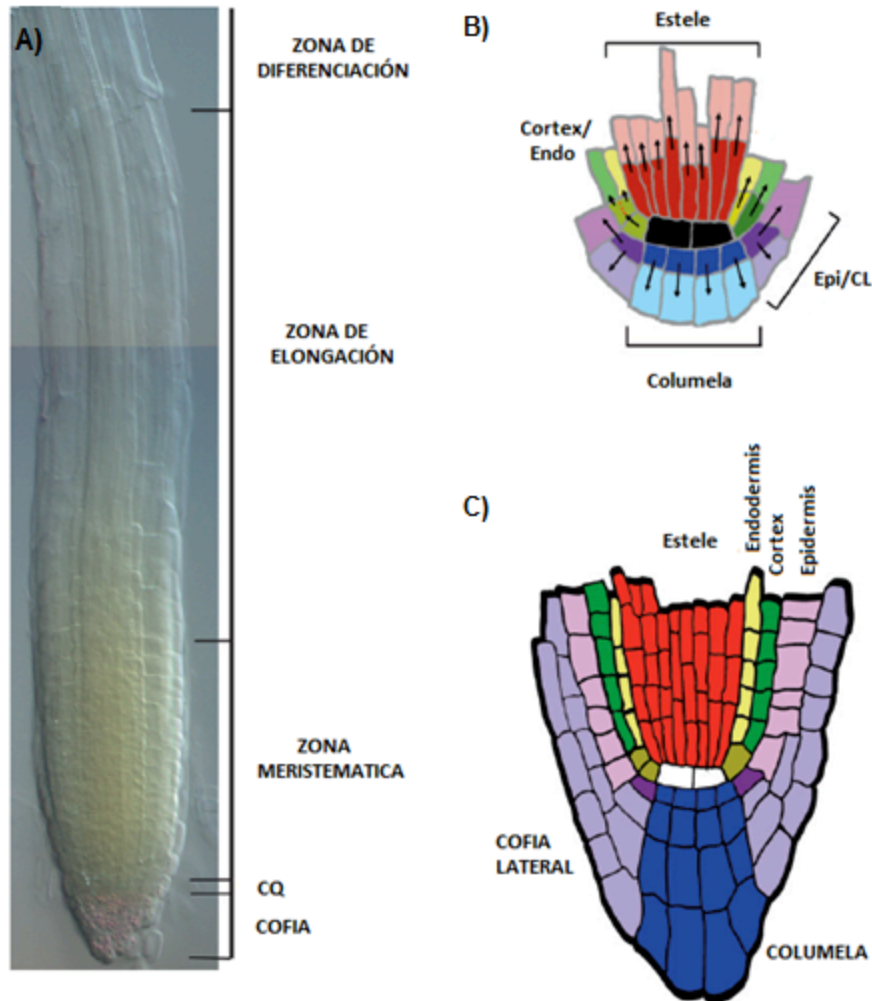


Figura 1. Estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. A) Representación de las distintas regiones que componen la raíz de *Arabidopsis thaliana*. B) Nicho de células troncales, las flechas indican los planos de división celular. C) Esquema de la raíz, en donde es posible apreciar las capas celulares que la componen. CQ (Centro quiescente), Epi/CL (Epidermis y Cofia lateral). Modificado de Bennett & Scheres 2010.

Debido a las características anteriormente mencionadas como su transparencia y tamaño pequeño, en la raíz pueden estudiarse con relativa facilidad, algunos procesos celulares y moleculares ocurridos durante el desarrollo en plantas, en particular los procesos de proliferación y diferenciación celular.

El balance entre proliferación y diferenciación celular involucra una expresión génica diferencial finamente regulada por numerosos factores de transcripción, reguladores epigenéticos, hormonas entre otros, los cuales se integran en complejas redes de

interacción. En particular, muchos de los factores de transcripción que participan en tales redes se agrupan en grandes familias multigénicas delimitadas generalmente por características estructurales de sus proteínas y en particular por sus dominios de unión a ADN.

1.3 Factores de transcripción tipo MADS-box en plantas

Una de las familias de factores transcripcionales más estudiada durante el desarrollo de las plantas es la denominada MADS-box. Los genes miembros de esta familia se caracterizan por presentar un motivo altamente conservado llamado caja MADS (MADS-box), el cual codifica para un dominio MADS de unión a ADN (Kaufmann *et al.*, 2005). El término MADS deriva de las iniciales de los primeros genes de esta familia que fueron clonados: *MINICHROMOSOME MAINTENANCE1 (MCM1)* de *Saccharomyces cerevisiae*, *AGAMOUS* de *Arabidopsis thaliana*, *DEFICIENS* de *Antirrhinum majus* y *SERUM RESPONSE FACTOR (SRF)* de humano (Shore & Sharrocks 1995).

Análisis filogenéticos han dividido a la familia MADS-box en dos grupos denominados Tipo I (SRF-like) y Tipo II (MEF2-like) (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a) ambos presentes en plantas, animales y hongos.

En particular, los MADS-box tipo II incluyen a los genes MEF2-like de animales y hongos, y a los genes MICK propios de plantas (Kaufmann *et al.*, 2005). Los genes MICK deben su nombre a su estructura modular consistente de cuatro dominios funcionales: Un dominio MADS (M) altamente conservado, una región intermedia (I), un dominio de dimerización tipo-keratina (K) y una región carboxilo terminal (C) (Figura 2).

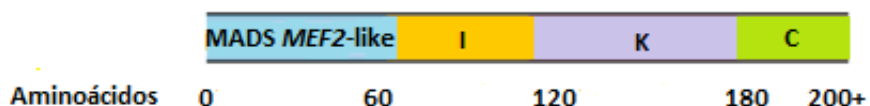


Figura 2. Estructura de los factores de transcripción MADS tipo II

El dominio MADS de unión a ADN, está compuesto de 60 aminoácidos (Kaufmann *et al.*, 2005). Este reconoce específicamente secuencias consenso CC(A/T)⁶GG y algunas variantes de esta secuencia, las cuales son denominadas cajas CARG (CARG box) y se encuentran presentes en la región promotora de sus genes blanco (Shore & Sharrocks 1995).

El dominio I (60 a 86 aminoácidos de longitud), río abajo del dominio MADS, está implicado en la formación de dímeros y la especificación en la formación de éstos (Shore & Sharrocks 1995).

El dominio K comprende de 87 a 150 aminoácidos hidrofóbicos dispuestos en un patrón regular. Su estructura es caracterizada por tres α -hélices denominadas K1, K2 y K3, las cuales conforman una estructura super enrollada tal como la que se encuentra en la queratina. Esta estructura tridimensional se cree está implicada en la formación de heterodímeros e interacciones proteína-proteína (Kaufmann *et al.*, 2005).

Finalmente el dominio C es la región menos conservada y más variable en longitud, que podría estar implicada en distintas funciones, como la estabilización de las interacciones mediadas por el dominio K, ser un requerimiento para la especificidad funcional y estar involucrado en la activación transcripcional (Alvarez-Buylla *et al.*, 2011; Theissen *et al.*, 2000).

De la familia MADS, los genes tipo II (MICK) fueron los primeros y mejor caracterizados en plantas (Alvarez-Buylla *et al.*, 2011), en comparación a los genes MADS-box tipo I (los cuales no presentan el dominio de dimerización K) (Nam *et al.*, 2004). Actualmente se sabe que los genes MADS-box tipo II están involucrados en una serie de importantes procesos del desarrollo tales como la morfogénesis floral (Coen & Meyerowitz 1991), el desarrollo del óvulo, crecimiento vegetativo, la embriogénesis y la formación del fruto (Paolacci *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque son mejor conocidos por sus funciones en la especificación de la identidad de órganos florales, la regulación del tiempo floral y otros aspectos de la biología reproductiva (Messenguy & Dubois 2003), también son ampliamente expresados en tejidos vegetativos (Parenicova *et al.*, 2003). Un gran número de ellos se expresan en raíz, los cuales en su mayoría no han sido caracterizados

totalmente o se sabe muy poco acerca de su expresión y función (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000a; Burgeff *et al.*, 2002; Gan *et al.*, 2005; Parenicova *et al.*, 2003; Rounsley *et al.*, 1995).

Entre algunos de los genes de la familia MADS fuertemente expresados en raíz y de los cuales ha comenzado a conocerse su papel funcional durante el desarrollo, están: *XAANTAL1/AGAMOUS-like 12 (XAL1/AGL12)*, *XAANTAL2/AGAMOUS-like 14 (XAL2/AGL14)*, *AGAMOUS-like 17 (AGL17)* y *AGAMOUS-like 19 (AGL19)*.

XAL1/AGL12 es un gen perteneciente al mismo clado que el gen floral *AGAMOUS*, se expresa en parte aérea, sin embargo la concentración más alta de mensajero se encuentra en la raíz (Tapia-Lopez *et al.*, 2008). Mutantes de pérdida de función de *XAL1/AGL12 (xal1)* presentan raíces cortas con una disminución en la tasa de producción celular y reducción en tamaño del RAM, en comparación a plantas silvestres (Figura 3). Aunado a esto, los mutantes *xal1* presentan un incremento en la duración del ciclo celular (Tapia-López *et al.*, 2008). Análisis preliminares muestran que *XAL1/AGL12* puede ser un regulador transcripcional de diferentes componentes de ciclo celular (García-Cruz, tesis doctoral en proceso) y con ello ser un regulador de la proliferación celular del meristemo de la raíz. En cuanto a la arquitectura celular del RAM de *xal1*, es evidente la desorganización del nicho de células troncales y columela, por lo que *XAL1/AGL12* también es necesario para la correcta organización del nicho de células troncales.

Un fenotipo similar al de los mutantes *xal1*, se observa en mutantes de pérdida de función del gen *XAL2/AGL14 (xal2)* (Figura 3). Estudios funcionales de *XAL2/AGL14*, un gen cercanamente relacionado al gen floral *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)* (Martínez-Castilla & Alvarez-Buylla 2003), han mostrado que es necesaria su función para el correcto desarrollo de la raíz.

A pesar de que el fenotipo observado entre las mutantes *xal1* y *xal2* es muy parecido, los mecanismos funcionales de cada uno de los genes parecen ser diferentes. Análisis cuantitativos de las raíces de *xal2* indican que hay una significativa disminución en el número de células meristemáticas, así como una baja tasa de producción celular y una

reducción en tamaño de la zona de elongación, lo que conlleva a la disminución en el tamaño de la raíz. Aunado a esto, se ha propuesto que *XAL2/AGL14* regula la expresión de genes implicados en la distribución de auxinas; una hormona que controla la proliferación y diferenciación celular de la raíz (Garay-Arroyo *et al.*, datos no publicados).

Contrario al papel funcional de *XAL1/AGL12* y *XAL2/AGL14* como reguladores positivos del desarrollo de la raíz, el gen *AGL17* parece actuar como represor del desarrollo radicular (Fonseca 2011; Pacheco-Escobedo, tesis doctoral en proceso). *AGL17* esta agrupado en el clado de *ANR1* conformado por genes que se expresan fuertemente en raíz (Martínez-Castilla & Alvarez-Buylla 2003). Plantas mutantes *agl17* muestran un ligero incremento en tamaño de este órgano en comparación al fenotipo observado en plantas silvestres (Figura 3). Datos obtenidos en dobles mutantes *xal1-agl17* y *xal2-agl17* indican que la ausencia de expresión de *AGL17* en mutantes *xal1* o *xal2* es suficiente para inducir el crecimiento y restablecer el tamaño observado en la raíz de cada mutante (Pacheco-Escobedo, tesis doctoral en proceso). Los datos obtenidos dentro del laboratorio sugieren que *AGL17* es un represor del crecimiento de la raíz, promoviendo la diferenciación y reprimiendo la proliferación celular.

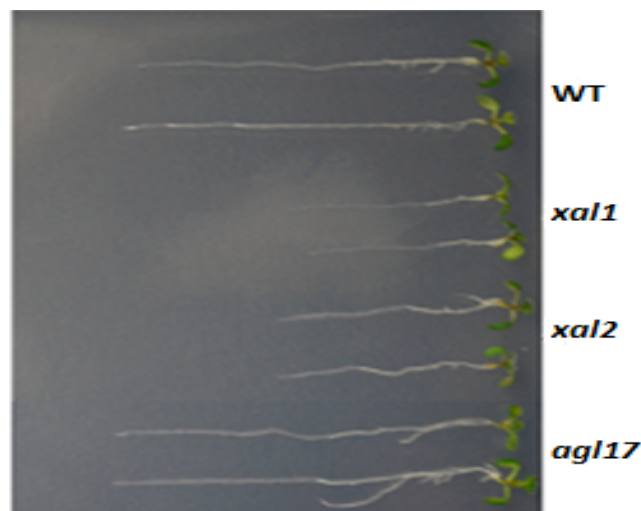


Figura 3. Plantas de 7 días de crecimiento silvestres WT (wild-type) y mutantes *xal1*, *xal2* o *agl17*. En donde se muestra el fenotipo radicular de cada mutante respecto a WT. Modificada de Pacheco-Escobedo, tesis doctoral en proceso.

1.4 Función de AGL19 en el desarrollo de la raíz

El gen *AGL19*, otro miembro de la familia MADS, se expresa fuertemente en raíz. Inicialmente se creyó que era un factor transcripcional específico de este órgano (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b) pero ya ha sido reportada también su expresión en la parte aérea (Schonrock *et al.*, 2006; Villajuana 2006). Mutantes de pérdida de función *agl19-3* (SALK_000234) muestran raíces cortas en comparación al fenotipo silvestre y una desorganización de las células de la columela (Figura 4) (datos por corroborar).

El fenotipo observado en las mutantes parece indicar que *AGL19* regula de manera positiva el desarrollo de la raíz, en particular, parece estar involucrado en el crecimiento de la raíz y su correcta organización celular (datos por corroborar); sin embargo, el mecanismo por el cual lo hace es desconocido.

El estudio de *AGL19* se ha relacionado directamente con el estudio de *XAL2/AGL14* gen con el que comparte más de un 80% de similitud a nivel de su secuencia codificante (Figura 5) y el 76% de similitud en su secuencia a nivel de aminoácidos de la región MIK (Figura 6) (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b).

Ambos genes presentan un patrón de expresión muy similar. Ensayos de hibridación *in situ* de *XAL2/AGL14* (Garay-Arroyo *et al.*, datos no publicados) han reportado su expresión en capas celulares de la raíz, donde se ha descrito la expresión del gen *AGL19* (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b). Por lo que en un principio se sugirió que ambos reguladores positivos del crecimiento de la raíz, podrían ser redundantes funcionalmente; sin embargo, aunque el fenotipo observado individualmente en ambos mutantes es parecido, todo parece indicar que *AGL19* y *XAL2/AGL14* participan de forma muy diferente en el desarrollo de la raíz.

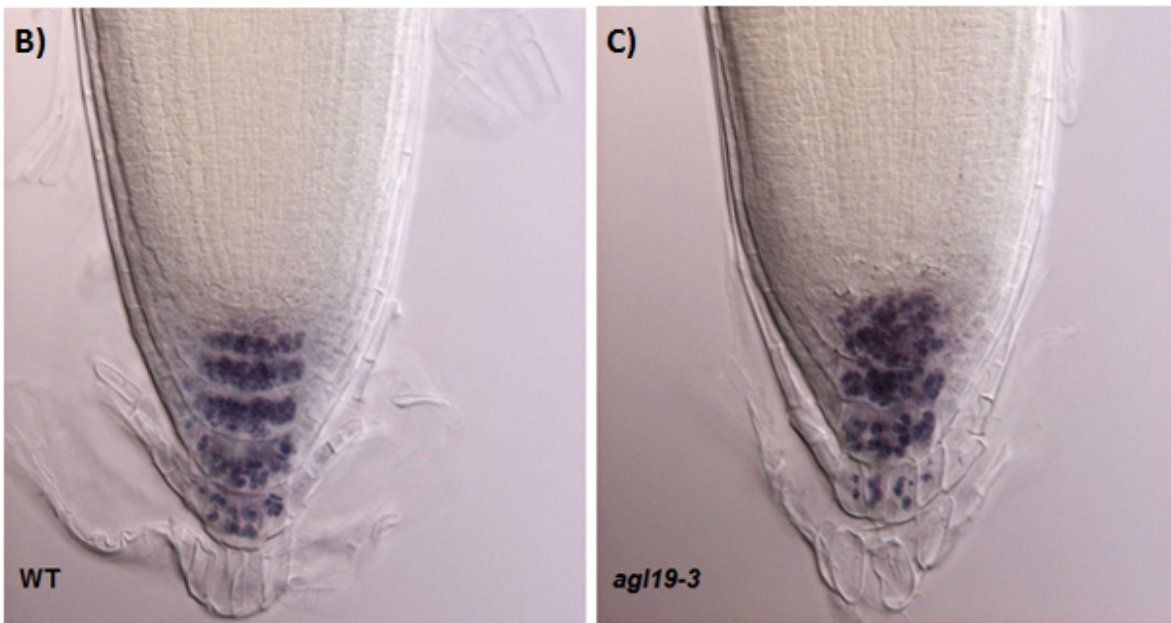
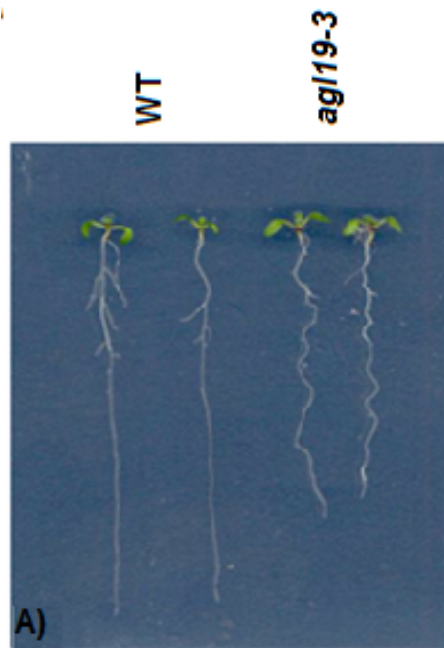


Figura 4. Comparación del fenotipo de plántulas silvestres (WT) y mutantes *agl19-3* de siete días
A) Diferencias en crecimiento radicular. B) Región meristémica de planta silvestre. C) La tinción de los gránulos de almidón con lugol permite observar los desarreglos en las capas de la columela en plantas *agl19-3* con respecto a la columela de plantas silvestres.

```

AGL19      ATGGTGAGGGGCAAACGGAGATGAAGAGGATAGAGAACGCAACAAGCAGGCAAGTGACG 60
XAL2/AGL14 ATGGTGAGGGGAAAGACAGAGATGAAGAGGATAGAGAACGCAACGAGCAGGCAAGTGACT 60
***** ** * *****

AGL19      TTTTCGAAGAGAAGAAATGGACTCTTGAAGAAAGCCTTCGAATTATCGGTCCTTTGTGAT 120
XAL2/AGL14 TTCTCAAAAAGAAGAAATGGACTTTTGAAGAAAGCTTTTGAATTATCAGTCCTTTGTGAT 120
** * * * ***** ** *****

AGL19      GCTGAAGTTGCTTTGGTTATCTTCTCTCCAAGATCCAACTCTATGAGTTCTCTAGCTCT 180
XAL2/AGL14 GCTGAAGTTGCCCTAATCATCTTCTCTCCTAGAGGCAACTCTATGAGTTCTCTAGCTCC 180
***** * * *****

AGL19      ---AGTATAGCAGCAACAATTGAACGCTATCAGAGACGAATAAAAAGAAATTGGGAATAAT 237
XAL2/AGL14 TCCAGTATACCTAAAACAGTAGAAAGATATCAAAGCGAATACAAGATCTCGGGTCTAAC 240
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AGL19      CATAAGAGAAATGATAATCTCAGCAAGCGAGAGACGAAACATCTGGATTGACAAAAAAG 297
XAL2/AGL14 CATAAGAGAAATGATAATTCACAGCAATCGAAGGACGAAACCTATGGCTTGCGCGAAAG 300
***** ***** ** ***** * * * * * * * * * * *

AGL19      ATTGAACAGCTAGAGATATCTAAACGAAAATTGCTTGGAGAAGGCATTGATGCATGTTCC 357
XAL2/AGL14 ATCGAACATTTGGAGATTTGCACACGAAAATGATGGGAGAAGGACTTGACGCATCTTCT 360
** ***** * ***** ** * ***** ** * ***** ***** ** * * *

AGL19      ATCGAGGAGCTGCAACAGTTAGAGAATCAGTTGGACCGAAGCTTGAGCAGGATAAGAGCC 417
XAL2/AGL14 ATAGAAGAGTTACAACAATTGGAGAACCAGTTGGACAGAAGCTTAATGAAAATAAGAGCC 420
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AGL19      AAGAAGTACCAATTACTCCGTGAAGAAATGAGAAGTTGAAGGCAGAGGAGAGGAATCTC 477
XAL2/AGL14 AAAAAGTACCAGTTATTACGAGAAGAACTGAGAAATTTAAAAGAAAAGGAGAGGAACCTC 480
** ***** ** * * * ***** ***** ** * * * ***** ** *

AGL19      GTTAAGGAAAATAAAGATCTGAAGGAGAAGTGGCTTGGAAATG---GGAACAGCAACAATA 534
XAL2/AGL14 ATTGCAGAAAATAAATGCTGATGGAGAAGTG---TGAGATGCAAGGAAGGAATAATA 537
** ***** ***** ***** ** * * * * * * * * * * *

AGL19      GCATCATACAATCAACGTTATCATCATCAGAAGTGAACATAGATGACAAT---ATGGAA 591
XAL2/AGL14 GGAAGAATATCATCATCATCAACATCAGAACTGGATATAGATGACAATGAAATGGAA 597
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AGL19      GTGGAGACTGGTTTGTTCATTGGACCTCCTGAGACAAGACAATCCAAAAAATTCCTCCT 651
XAL2/AGL14 GTGGTGACTGATTTGTTCATTGGACCTCCTGAGACTCGACTTCAAAAAGTTTCCTCCT 657
**** ***** ***** ***** ***** * ***** ** *****

AGL19      CAAAATTAA 660
XAL2/AGL14 TCAAATAA 666
*** **

```

Figura 5. Comparación de la secuencia codificante de *AGL19* y *XAL2/AGL14*. Identidad: 81.06%.

AGL19	MVRGKTEMKRIENATSRQVTFSKRRNGLLKKAFELSVLCDAEVALVIFSPRSKLYEFSSS	60
XAL2/AGL14	MVRGKTEMKRIENATSRQVTFSKRRNGLLKKAFELSVLCDAEVALIIFSPRGKLYEFSSS	60
	*****:*****.*****	
AGL19	-SIAATIERYQRRIKEIGNNHNRNDNSQQARDETSGLTKKIEQLEISKRKLLEGIDACS	119
XAL2/AGL14	SSIPKTVERYQKRIQDLGSNHKRNDNSQQSKDETYGLARKIEHLEISTRKMMGEGLDASS	120
	** *:****:*.::*.*****:*** **:***:***.***.***:***:*.*	
AGL19	IEELQQLLENQLDRSLSRIRAKKYQLLREEIEKLKAEERNLVKENKDLKEKWLGMGTATIA	179
XAL2/AGL14	IEELQQLLENQLDRSLMKIRAKKYQLLREETEKLKEKERNLIAENKMLMEKCEMQRGIIG	180
	*****:***** **** *:***: *** * ** * . *	
AGL19	SSQSTLSSEVNIDD-NMEVETGLFIGPPETRQSKKFPQN	219
XAL2/AGL14	RISSSSSTSELDIDDNEMEVVTDLFIGPPETRHFKKFPASN	221
	.*: **:***:*** :*** * *****: *****.*	

Figura 6. Comparación de la secuencia de aminoácidos del gen *AGL19* y *XAL2/AGL14*, en donde es posible apreciar un 75.6 % de identidad entre ambas proteínas. *aminoácidos idénticos, : aminoácidos similares, . aminoácidos similares.

1.5 Métodos de estudio para la determinación del patrón de expresión génica.

El análisis de la expresión génica es crucial para la caracterización funcional de los genes. Por lo tanto, esclarecer el patrón de expresión en un momento y espacio determinados, es parte fundamental de la investigación durante el desarrollo. Para ello, ha sido de gran importancia el desarrollo de métodos cada vez más específicos y de mayor sensibilidad, que ofrezcan información fiable y certera acerca del patrón de expresión génica (Bruno *et al.*, 2011).

En particular, para el estudio del ARN mensajero, se han desarrollado métodos de análisis como el Northern blot y la RT-PCR; sin embargo, en estas técnicas el método de extracción

de ARN puede producir resultados variables (algunos métodos de extracción son más sensibles a ciertos tipos de ARN), así como una nula información referente al patrón de expresión espacial (MacFadden 1995).

La técnica de hibridación *in situ* (ISH, por sus siglas en inglés) ARN:ARN, es un método de localización específica de transcritos, que nos permite, a diferencia de los métodos anteriormente mencionados, estudiar el modelo de expresión espacio-temporal de los genes (de Almeida *et al.*, , 1998). Esta técnica no solo es una herramienta útil para el análisis de la expresión de ARN mensajero (ARNm), sino que en base al patrón de expresión génica tejido-específico de los transcritos, en algunos casos es posible deducir la localización de la proteína para la cual codifican (Bruno *et al.*, 2011, Burgeff *et al.*, 2002)

La técnica está basada en la hibridación de un ARN mensajero celular de cadena sencilla con una hebra de ARN complementaria, la cual es denominada sonda. La sonda puede ser radioactiva y con ello la hibridación puede ser detectada por autoradiografía, o estar marcada con un grupo hapteno (no radioactivas) y ser visualizada directa o indirectamente por inmunocitoquímica.

De manera general, la técnica involucra una serie de pasos secuenciales (Figura 7) entre los que destacan: 1) La generación de la sonda marcada frecuentemente por transcripción *in vitro*. 2) La fijación del tejido a trabajar con la finalidad de mantener íntegra la estructura y composición química celular. 3) Un pre-tratamiento de las muestras cuya finalidad es permeabilizar el tejido para incrementar la accesibilidad de la sonda a la secuencia objetivo, así como la preparación del tejido a las condiciones de hibridación. 4) La hibridación de la sonda marcada a la secuencia objetivo. 5) La remoción de la sonda no hibridada a través de una serie de lavados y 6) La detección de la sonda hibridada.

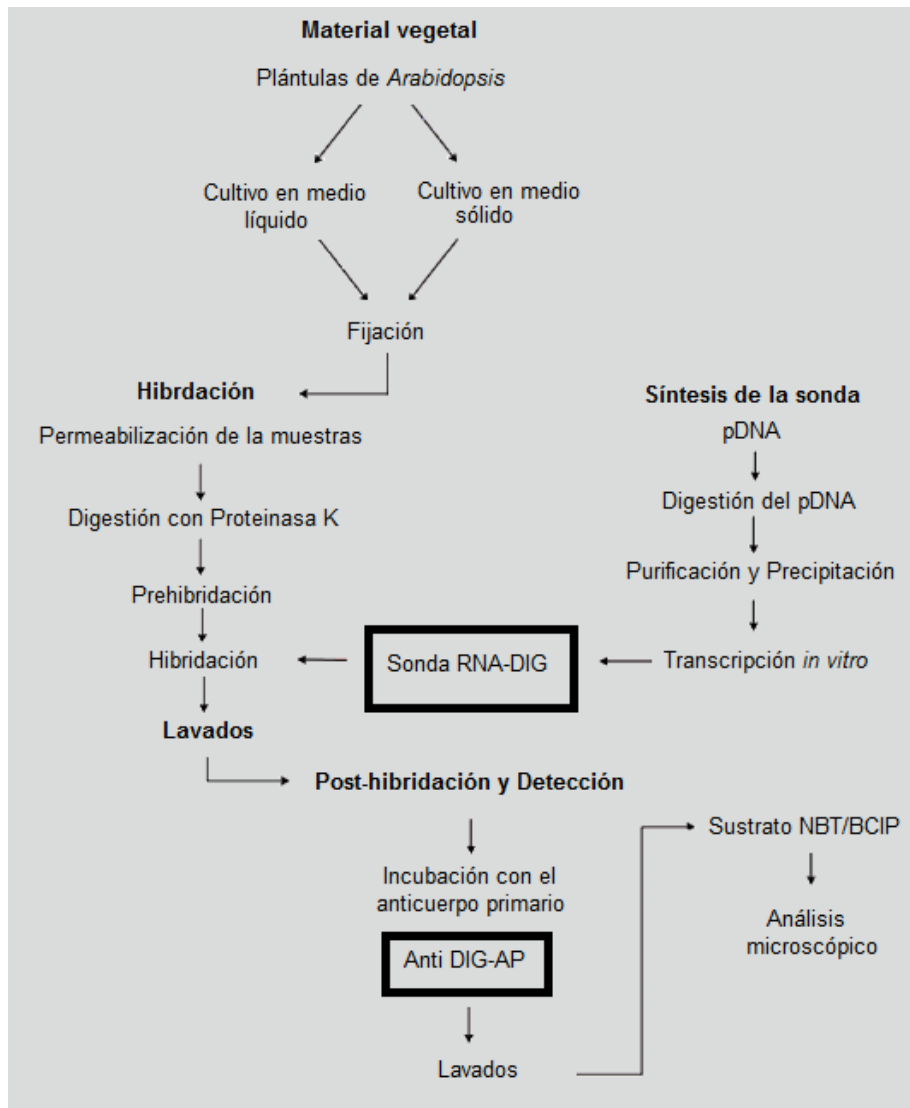


Figura 7. Técnica de hibridación *in situ* en plantas. Modificado de Bruno *et al.*, 2011.

Actualmente existen varias alternativas para elegir el tipo de sonda y los métodos de marcaje y detección. Importantes avances han sido logrados con el uso de sondas no radioactivas, las cuales han sido muy utilizadas, dado su alta estabilidad, resolución a nivel celular, rápida detección, bajo costo y sobre todo seguridad (Wilkinson 1998, Childs 2000). En las sondas no radioactivas se encuentran incorporados nucleótidos modificados que tienen unido un grupo hapteno que es reconocido por un anticuerpo. El anticuerpo puede estar acoplado a una enzima, que en presencia de un sustrato cromogénico produce un compuesto insoluble y de color.

Los haptenos comúnmente utilizados son la digoxigenina (DIG), fluoresceína (FITC) y biotina. Entre los que destaca la digoxigenina, hapteno frecuente utilizado por su alta estabilidad y rápido sistema de detección. Este esteroide extraído de las plantas *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*, está incorporado a las bases uracilo de la sonda de ARN (UTP-DIG). Su detección está dada por la especificidad de fragmentos Fab Anti-DIG conjugados con una enzima fosfatasa alcalina la cual en presencia del sustrato NBT/BCIP produce un compuesto insoluble de coloración azul (Wilkinson 1998, Morel 2001).

Aunque conceptualmente la técnica parece ser simple, es afectada por múltiples variables como la estabilidad y accesibilidad de la secuencia objetivo, el método de fijación celular, las condiciones de prehibridación e hibridación, la elección del sistema de detección, el tamaño, la especificidad y la naturaleza de la sonda, por lo que cada tejido y secuencia génica a investigar requieren diferentes condiciones óptimas para cada una de estas variables.

1.6 Hibridación *in situ* “whole mount” (WISH)

La técnica clásica para la localización *in situ* de transcritos, es realizada en secciones de tejido. El material biológico a trabajar requiere de un procesamiento que demanda mucha experiencia y sobre todo tiempo además del daño y alteración que el tejido puede sufrir durante los procesos de inclusión y microtomía.

Con la finalidad principal de mantener íntegra la estructura y composición celular de los tejidos, se han desarrollado nuevas técnicas de hibridación *in situ*, las cuales no solo permiten una rápida localización del transcrito sino también la alteración mínima de la muestra.

Éste es el caso de la técnica de hibridación *in situ* “whole mount” (WISH), la cual es muy similar a la que se realiza en cortes histológicos con la excepción de que el tejido u organismo a trabajar no es alterado en estructura, el tejido completo es procesado durante toda la técnica por lo que la visualización de los transcritos puede ser apreciada en células individuales, proporcionando un modelo tridimensional del patrón de expresión génica.

1.7 WISH en tejidos de plantas.

La técnica de WISH inicialmente fue desarrollada para la localización *in situ* de transcritos en embriones de *Drosophila melanogaster* (Tautz & Pfeifle 1989) y a partir de este método se han desarrollado nuevos protocolos tanto para otras células animales como de plantas. Su adaptación a los tejidos vegetales ha tenido que enfrentar diversas limitaciones, como la presencia de la pared celular, la cual es una barrera a la permeabilidad de los reactivos; no obstante, numerosos protocolos ya han sido exitosamente desarrollados y cada vez son más sensibles y rápidos de realizar.

Los protocolos de WISH descritos por Ludevid *et al.*, (1992), Bennett *et al.*, (1996) y Almeida *et al.*, (1998), han sido la base para la estandarización de un protocolo de mayor especificidad y fácil realización en plantas (Friml *et al.*, 2003). El más conocido es el desarrollado por Hejártko *et al.*, (2006), el cual fue diseñado para el estudio de la expresión génica en embriones, raíces, hipocotilos y hojas de plántulas de *Arabidopsis thaliana*. La técnica completa se lleva a cabo en aproximadamente siete días, bajo la premisa de generar resultados con bajo fondo (“background”) y controles totalmente limpios de señal. Sin embargo, como se mencionó anteriormente ningún protocolo ha llegado a ser universal y múltiples modificaciones pueden ser realizadas de acuerdo a los fines de la investigación, lo que ha llevado a una disposición vasta de protocolos de WISH.

2. Antecedentes inmediatos

Con base en la técnica de hibridación *in situ* realizada en secciones de tejidos, en el año 2000 se reportó el patrón de expresión de *AGL19* en la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b, Burgeff *et al.*, 2001) La señal fue observada en células de la columela, cofia lateral y epidermis de la región meristemática, tanto en la raíz principal como en las raíces laterales. En la zona de diferenciación, el ARNm de *AGL19* fue observado solo en los tipos celulares del haz vascular (Figura 8).

Para realizar estos ensayos se utilizó una sonda de 670 pares de bases (pb), que posteriormente fue hidrolizada. El gran tamaño de la sonda indica que está abarca toda la secuencia codificante del gen (de 660 pb), reportada actualmente en la base de datos del TAIR para *AGL19* (At4g22950) por lo que existe la probabilidad de que no solo haya hibridado con el ARNm de *AGL19*, sino también con otros transcritos de factores transcripcionales tipo MADS. Por otra parte, al utilizar una sonda hidrolizada no podemos saber con exactitud qué región de esta fue con la que finalmente hibridó el mensajero de *AGL19*.

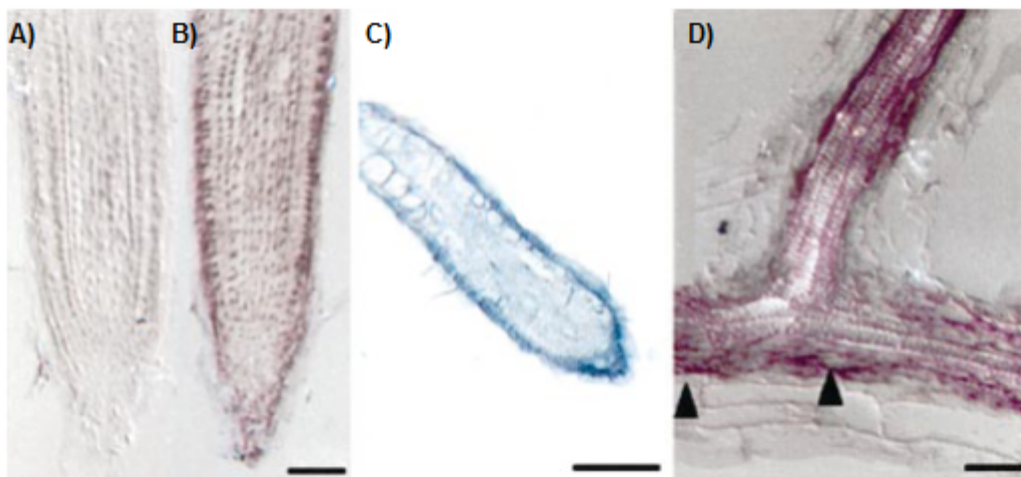


Figura 8. Expresión de *AGL19* en raíces de plantas silvestres. Sección longitudinal del meristemo de la raíz principal: A) con la sonda de ARN sentido y B) con la sonda de ARN antisentido. Detección de *AGL19* en C) raíz lateral y D) en raíz madura hibridada con la sonda ARN antisentido de *AGL19*. Las fechas indican células de la endodermis. Imagen tomada de Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b

Posterior a este trabajo no se han publicado nuevos resultados de hibridaciones *in situ* de *AGL19* en tejido de la raíz.

Por lo anterior y dada la necesidad de esclarecer el patrón de expresión tridimensional de los genes MADS-box durante el desarrollo, este estudio estará enfocado al conocimiento del patrón de expresión de *AGL19* en el tejido de raíz.

Para ello, la técnica de WISH es una herramienta que nos permitirá analizar su expresión y localización en un tiempo-espacio determinado, lo cual es crucial para elucidar su organización y función durante el desarrollo de este órgano.

En nuestro laboratorio el protocolo de WISH publicado por Hejátko *et al.*, (2006) se ha empleado para el análisis de expresión de algunos factores transcripcionales tipo MADS en la raíz, tal es el caso del gen *AGL19*. Sin embargo, numerosos ensayos han sido realizados y no ha sido posible evitar la gran cantidad de señal inespecífica, así como el maltrato de los tejidos. En el caso de la raíz, ha sido muy difícil obtener datos en tejidos íntegros debido a que las raíces de *Arabidopsis*, en comparación a estructuras como el embrión o la flor, son órganos muy frágiles que fácilmente se maltratan durante el proceso y el daño o pérdida de la zona meristemática llega a ser inminente. Por lo anterior, este trabajo está enfocado a estandarizar la técnica de hibridación *in situ* WISH para determinar la expresión de *AGL19*.

3. Planteamiento del problema

Los genes MADS-box están involucrados en una serie de importantes procesos del desarrollo en plantas, como los de proliferación y diferenciación celular. Esclarecer su patrón de expresión en un tiempo-espacio determinados es parte importante de su estudio como reguladores de la organogénesis, para ello la técnica de hibridación *in situ* es una buena opción; sin embargo, la fragilidad de tejidos como la raíz ha sido un problema constante, así como la alta cantidad de señal inespecífica relacionada a la gran similitud entre los miembros de esta familia multigénica.

4. Hipótesis

De acuerdo a las características de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, sí se modifican algunos puntos determinantes de la técnica de WISH, como la fijación, la concentración de la sonda, anticuerpo y tiempo de incubación, entonces se logrará la optimización de la técnica para la detección de transcritos de los genes MADS-box en este tejido, particularmente del gen *AGL19* lo que contribuirá a su caracterización funcional.

5. Objetivos

Objetivo general

Analizar el patrón de expresión espacio-temporal del gen *AGAMOUS-like 19 (AGL19)* en la raíz de *Arabidopsis thaliana* por medio de la técnica de WISH y contribuir con ello a su caracterización funcional durante el desarrollo radicular.

Objetivos particulares

1. Estandarizar la técnica de WISH para la localización de transcritos en la raíz.
2. Analizar la expresión del gen *AGL19* durante el desarrollo de la raíz.
3. Determinar el patrón de expresión espacio-temporal del gen *AGL19* en la raíz de plantas silvestres y mutantes *agl19-3*, por medio de la técnica de WISH.
4. Determinar la expresión génica espacio-temporal de *AGL19* en mutantes de *XAL2/AGL14*, un gen relacionado a *AGL19* y comparar el patrón de expresión observado con el de plantas silvestres.

6. Método experimental

6.1 Material biológico y condiciones de crecimiento

En este estudio se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) como control y dos líneas mutantes de *AGL19* (*agl19-3*; SALK_000234) y *XAL2/AGL14* (*xal2-2*).

El mutante *agl19-3* presenta una inserción de T-ADN entre los límites del cuarto intrón, a 2460 pb del codón de inicio de la transcripción. En tanto que el mutante *xal2-2* presenta una inserción por transposon del tipo En-1 (Baumann *et al.*, 1998) al final del quinto exón (Figura 1; Anexo).

Las semillas de plantas control (Col-0) y procedentes de líneas homocigotas de *agl19-3* y *xal2-2*, fueron desinfectadas con una solución 60% Cloro y Tween®-20 al 0.001%, durante 5 minutos; después se enjuagaron cinco veces en agua destilada y estéril. Para asegurar una germinación uniforme fueron estratificadas a 4°C durante tres días. Posteriormente, se sembraron en placas de medio sólido Murashige-Skoog (MP Biomedicals) 0.2X más 10% de sacarosa, pH 5.6 y fueron colocadas verticalmente en cámaras de crecimiento Conviron, con temperatura de crecimiento de 22°C bajo fotoperiodo de día largo (18 horas luz y 6 horas oscuridad).

6.2 Extracción de ARN y RT-PCR

Se realizó la extracción de ARN total de la raíz de plantas control de 5, 7 y 9 días post siembra (dps) y plantas de *agl19-3* y *xal2-2* solo de 7 dps, utilizando el método de Trizol® (Invitrogen™). Las raíces fueron congeladas a 70°C, pesadas y posteriormente maceradas hasta obtener un polvo fino y homogéneo, evitando en todo momento el descongelamiento del tejido. Se agregó 1 ml de Trizol® por cada 100 mg de tejido y las muestras fueron colocadas 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos extracciones con cloroformo y se precipitó con isopropanol frío durante

una hora a -20°C. Las muestras de ARN se centrifugaron y lavaron dos veces con 500 µl de etanol 75% para finalmente resuspender el pellet en 20 µl de agua MilliQ.

Una vez determinada la concentración e integridad de cada una de las muestras de ARN, se sintetizó el ADNc de cada una de ellas utilizando el kit “First-strand cDNA Synthesis Using SuperScript™ II RT” (Invitrogen™). La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, para ello se agregó en un tubo 0.5 µM de oligo dT y 0.5 mM total de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) con 200 ng de muestra de ARN, esta reacción se incubó a 65°C por 5 minutos. Posteriormente, a cada muestra se adicionó 1X de amortiguador First Strand, 10mM de DTT, 40U de RNAsout™ y 200U de la enzima SuperScript™ II RT; la síntesis de ADNc se realizó a 42°C por 50 minutos y la enzima se inactivó a 70°C por 15 minutos.

Para determinar la expresión de los genes de interés se usaron oligonucleótidos específicos para amplificar el gen *AGL19* y *XAL2/AGL14*; como control interno se usaron oligonucleótidos para amplificar *TUBULINA2* (Tabla 1; Anexos). Para la reacción de amplificación (reacción en cadena de la polimerasa o PCR) se utilizó el kit de PCR Invitrogen™. Se agregó 1X amortiguador PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 10 µM total de dNTPs, 0.9U de *Taq* Polimerasa™, 0.4 µM de oligonucleótidos, 1 µl de ADNc.

6.3 Hibridación in situ “whole mount”

6.3.1 Preparación de la sonda

La sonda de ARNm *AGL19* (Proporcionada por el M. en C. Pérez-Ruiz) fue clonada dentro del vector pGEM-T Easy (Promega™) (pGEM-T *AGL19*) delimitada por los promotores de las enzimas ARN polimerasa T7 (Promega™) y SP6 (Promega™) (Figura S2; Anexos). Tal secuencia presenta una longitud de 108 pb, correspondiente a la región codificante del gen 400 nucleótidos río abajo del dominio MADS (Figura S3; Anexos).

Bacterias DH5α termo-competentes fueron transformadas con el vector pGEM-T *AGL19* y seleccionadas en medio LB sólido con una concentración de 50 µg de ampicilina por 24 horas a 37 °C. Las colonias resistentes fueron crecidas en medio LB líquido durante 24 horas a 37°C en constante agitación (200 rpm), para finalmente realizar la extracción del vector con el kit de extracción Mini-prep (Promega).

El vector pGEM-T *AGL19* fue linearizado con la enzima *SacI*TM (Biolabs[®]) o con *SacII*TM (Biolabs[®]). Para la reacción de digestión se adicionaron 60U de la enzima de restricción, 1X del amortiguador correspondiente a cada enzima de restricción, 1X de BSA y 20 µg de plásmido en un volumen final de 25 µl. La reacción se realizó a 37°C por dos horas.

Los productos de la digestión se purificaron en geles de agarosa 1 % de bajo punto de fusión. Para ello, ambos productos fueron cortados y colocados en tubos eppendorf independientes con 500 µl de Tris-Hcl 1M pH 7.5, se calentaron a 65°C por 5 minutos y se filtraron en una columna con papel filtro. Se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se precipitó con 2.5 vol. de etanol 100% y 1/10 vol. de NaAc 3M. El ADN obtenido fue cuantificado para usarse como molde para la obtención de la sonda de ARN marcada.

La sonda de ARN marcada con digoxigenina (ribosonda), fue sintetizada por transcripción *in vitro* en presencia de digoxigenina-11-UTP (DIG RNA labeling mixTM, Roche), utilizando la ARN polimerasa SP6 y el ADN digerido con *SacI*TM para la síntesis de la sonda sentido y la ARN polimerasa T7 y el ADN digerido con *SacI*TM para la síntesis de la sonda antisentido. Para la reacción de transcripción se agregó 1X de amortiguador "Transcription Optimizad" (Promega), 2 µl de DIG RNA labeling mixTM (Roche), 40U de RNAsasin[®] (Promega), 10mM de DTT (Promega), 2 µl (10-20 U/µl) de la enzima correspondiente y 1000 ng de ADN.

La reacción se realizó a 37°C por tres horas. Posteriormente se eliminó el templado de ADN con 2 µl de DNAsa I (InvitrogenTM) a 37°C por 15 min y la reacción se detuvo con 20 mM de EDTA. Las sondas se precipitaron con 2.5 vol. de etanol al 100% y 1/10 vol. de NaAc 3M toda la noche a -20°C. Finalmente las sondas se centrifugaron a 10 000 rpm durante 20 minutos y se lavaron con 500 µl de etanol 75%.

Con la finalidad de determinar si los productos generados por transcripción *in vitro* correspondían a la sonda de ARNm *AGL19*, se sintetizó el ADNc de cada uno de los transcritos con oligonucleótidos específicos de la sonda. Para ello se mezclaron 10 µM total de dNTPs, 3 µl de sonda, 1 µl de primer y 4 µl de MilliQ. Para la síntesis de la sonda SP6 (Sentido) se utilizó el oligonucleótido *AGL19* R NORTH [10 µM], mientras que para la

síntesis del ADNc de la sonda T7 (Antisentido) el primer AGL19 F NORTH [10 μ M] (Tabla 2; Anexos).

6.3.2 Fijación del tejido

Las plántulas de 7 días post siembra (dps) fueron fijadas en vacío durante 10 minutos con solución de fijación (PFA 4%, DMSO 15%, Tween20 0.1% en MTSB 1X; ver en anexo la composición de soluciones). Posteriormente se colocaron a 4°C por 50 minutos en agitación. Las muestras fijadas se lavaron una vez con amortiguador MTSB 1X / TritónTMX-100 0.1% por 10 minutos, dos veces en PBS 1X / TritónTMX-100 0.1% por 10 minutos, 2 veces en PBS 1X por 5 minutos y una vez en agua destilada por 5 minutos.

Posteriormente las plántulas se colocaron en portaobjetos cargados (FisherBiotech) y se dejaron durante dos o tres días a temperatura ambiente. Finalmente, con la ayuda de una navaja estéril se retiraron los cotiledones y se colocaron a 4 °C hasta ser utilizadas en un tiempo máximo de dos semanas.

6.3.3 Permeabilización e hibridación

Los portaobjetos con las raíces adheridas fueron colocados en cajas de vidrio. Las muestras fueron permeabilizadas con CitrisolvTM (FisherBrand[®]) -etanol 100% 1:1, por 30 minutos, se volvieron a fijar a temperatura ambiente por 20 minutos y fueron lavadas dos veces con PBT durante 10 minutos. Después se realizó una digestión con Proteinasa K (Roche) a una concentración de 125 μ g/ml por 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se detuvo la reacción con un lavado de Glicina 2mg/ml en PBS durante 5 minutos.

Se realizó un lavado rápido y uno por 10 minutos con PBT. Una vez más las plántulas fueron fijadas a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se realizó otro lavado rápido y uno por 20 minutos con PBT. Consecuentemente las raíces se lavaron en solución de hibridación (Formamida 50%, SSC 5X, Tween[®]-20 0.1%, 0.1 mg ml⁻¹ Heparina) durante 10

minutos y se prehibridaron por una hora a 55°C en una cámara húmeda con SSC 5X. Posteriormente se hibridó con 2.5 ml de solución de hibridación con 1 µg/ml de sonda sentido (control) o antisentido y 150 ng/ml de tRNA (Roche) por portaobjetos, a una temperatura de 55°C en agitación durante 16 horas.

6.3.4 Lavados de las muestras

Después de la hibridación, se realizó un lavado rápido, por 60 minutos y otro por 20 minutos con formamida 50%/ SSC 2X/ Tween®-20 0.1% a 55°C. Un lavado con SSC 2X / Tween®-20 0.1% por 20 minutos a 55°C, dos lavados SSC 0.2X / Tween®-20 al 0.1% por 20 minutos cada uno a 55°C. Dos lavados más con SSC 0.1X / Tween®-20 al 0.2% por 20 minutos a 55°C y finalmente un lavado con PBT por 10 minutos a temperatura ambiente.

6.3.5 Detección de la sonda

Las muestras fueron bloqueadas con una solución de PBS 1X / Tween®-20 0.1% /BSA 1% por 90 minutos a temperatura ambiente.

El anticuerpo Anti-Dig-AP, Fab Fragments (Roche) a una dilución 1:1500 fue preabsorbido en PBS 1X/ Tween®-20 0.1% /BSA 1% a 4°C, 3 horas antes de la incubación. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo preabsorbido durante 2 horas con 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

El anticuerpo no unido se eliminó mediante cuatro lavados con PBT durante 20 minutos cada uno. Posteriormente las muestras se lavaron con amortiguador de detección durante 10 minutos y fueron colocadas en oscuridad con 2.25 µl NBT/ml (Roche), 1.17BCIP/ml (Roche) y 2mM/ml de Levamisol en amortiguador de detección (Tris 0.1M pH 9.5, NaCl 0.1M, MgCl₂ 50mM, Tween®-20 al 0.1%).

La reacción se detuvo cuando se empezó a observar señal en los controles negativos (aproximadamente 1:30 horas), enjuagando rápidamente las muestras cuatro veces en amortiguador PBS IX. Posteriormente, cada muestra fue hidratada con glicerol 50% en PBS durante 10 a 15 minutos.

Para realizar el montaje de las muestras se agregó 400 μ l de solución de aclaramiento (4.2 M de NaCl, 8 mM de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ preparado en glicerol al 65% y 2% de DMSO) (Dubrovsky *et al.*, 2009) y se observaron 15 minutos después en un microscopio Nomarski (DIC) en un lapso de tiempo no mayor a 7 días.

7. Resultados

7.1 Estandarización de la técnica de WISH para la localización de transcritos en la raíz.

7.1.1 La fijación del tejido, la concentración y tiempo de incubación del anticuerpo fueron los puntos determinantes para la estandarización de la técnica de WISH

Con la finalidad de estandarizar un protocolo de WISH para la detección de transcritos en raíz, los primeros ensayos se realizaron en base al protocolo publicado por Hejátko *et al.*, (2006), con modificaciones en el número de lavados de acuerdo a ensayos preliminares realizados en el laboratorio.

La fijación química con PFA 4% en PBS no fue suficiente para mantener la integridad del tejido. Las células mostraban un tamaño irregular y frecuentemente las capas celulares de la epidermis se desprendían con facilidad, característica directamente relacionada a una fijación ineficiente (Figura 9). Dado que este protocolo de fijación no ofrecía la resistencia mecánica necesaria al tejido, se optó por sustituir el amortiguador PBS de la solución de fijación por el Amortiguador Estabilizador de Microtúbulos (por sus siglas en inglés; MTSB) frecuentemente utilizado en técnicas de inmunolocalización de proteínas en tejidos (Szechynska-Hebda *et al.*, 2006). Así mismo, para incrementar la tasa de penetración del fijador en el tejido, las muestras fueron fijadas en vacío por un lapso de tiempo no mayor a 10 minutos.

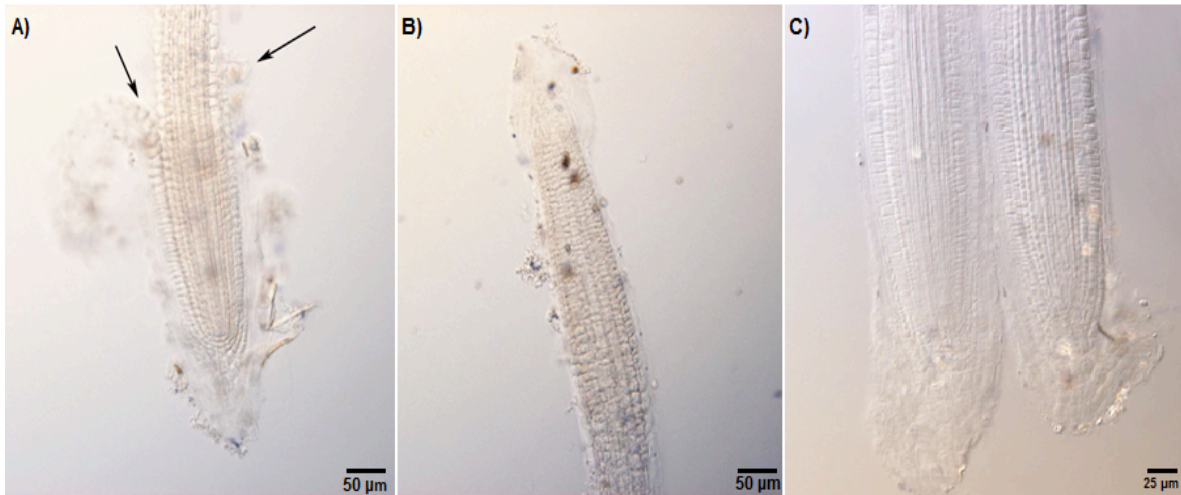


Figura 9. Fijación química de raíces de *Arabidopsis thaliana*. A y B) Fijación con PFA en PBS. En A las flechas indican el desprendimiento de capas celulares de la epidermis. En B la raíz está desprovista de epidermis. C) Raíces fijadas con PFA en MTSB. Es posible observar la integridad de las capas celulares de epidermis, columela y cofia lateral.

La permeabilización de las muestras y la subsecuente rehidratación de las raíces con una serie descendente de alcoholes, incrementó la traslucidez del tejido, lo que provocó la pérdida de las muestras durante los lavados por falta de visualización de las mismas. Este tratamiento tiene como finalidad incrementar la permeabilidad del tejido, eliminando lípidos de la membrana celular (Wilkinson 1998) y en particular para plantas la eliminación de ceras cuticulares; dado que en la raíz la proporción de ceras es menor en comparación a la parte aérea, se determinó que la permeabilización con el solvente Citrisolv y Proteínasa K era suficiente para facilitar la penetración de la sonda ARNm *AGL19* en el tejido radicular, por lo que se omitió el uso de heptano y alcoholes usados en el protocolo de Hejátko *et al.*, (2006).

La incubación de las muestras en el anticuerpo Anti-DIG-AP a una concentración de 1:2000 a temperatura ambiente durante toda la noche produjo gran cantidad de señal, aún en ensayos de prueba sin sonda. Esta señal fue interpretada como inespecífica debido a que no fue posible determinar ningún patrón de expresión (Figura 10.A, B y C), aunado al hecho de mostrar el mismo patrón en ensayos control sin sonda (Figura 10.D). Con la

finalidad de eliminar esta gran cantidad de señal inespecífica se modificaron las condiciones de concentración y tiempo de incubación del anticuerpo, reduciendo el tiempo de incubación a solo 2.30 horas e incrementando su concentración a 1:1500 a temperatura ambiente. Además se modificó el número de lavados, adicionando dos lavados más con sales de menor concentración. Bajo estas nuevas condiciones se logró eliminar en su totalidad el fondo o “background” anteriormente observado en las muestras.

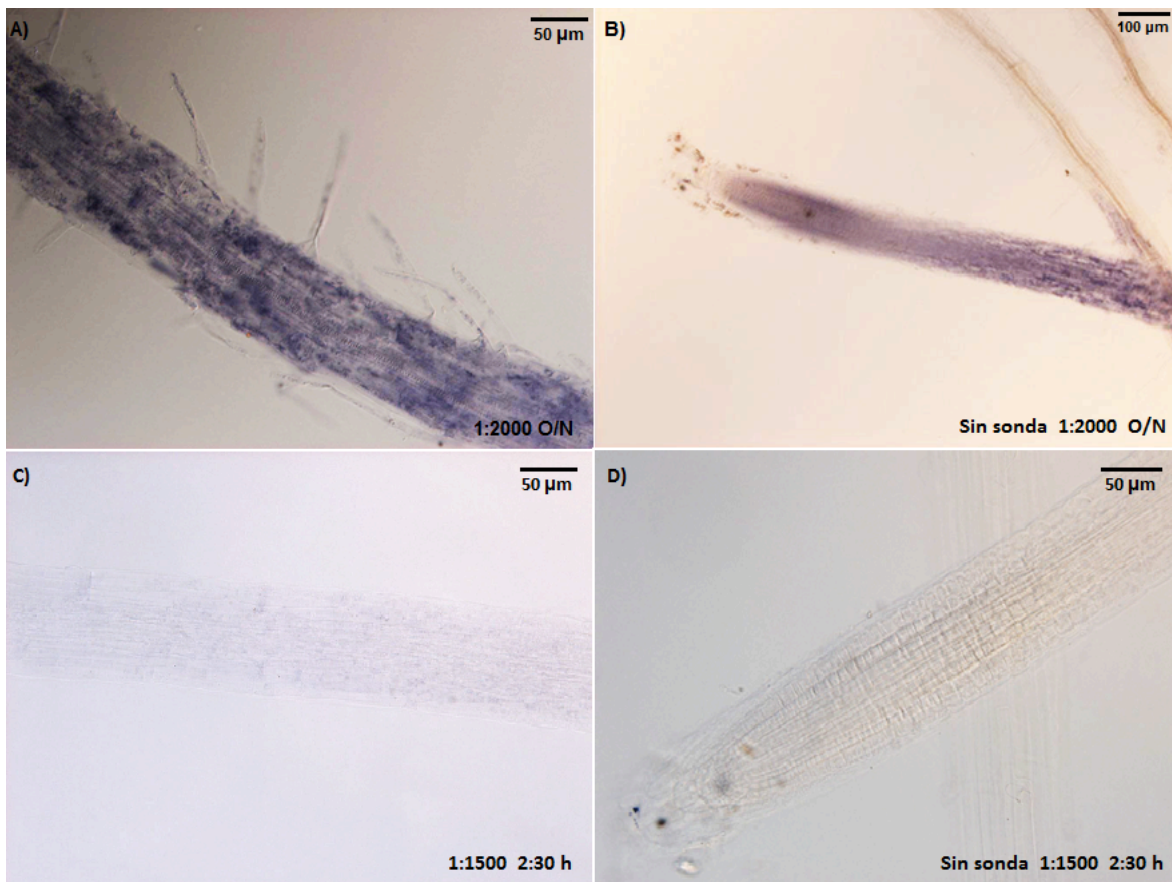


Figura 10. Ensayos de hibridación *in situ* del gen *AGL19* modificando el tiempo y concentración del anticuerpo. Resultados obtenidos con una concentración de 1:2000 y la incubación toda la noche (O/N). A) Señal inespecífica observada en la zona de diferenciación de la raíz. B) Señal inespecífica observada en ensayos de prueba sin sonda. Resultados obtenidos incrementando la concentración a 1:500 y reduciendo el tiempo de incubación a 2:30 horas C) Eliminación del fondo. D) Ausencia de señal inespecífica en ensayos de prueba sin sonda

Por otra parte, la concentración de la sonda de ARNm *AGL19* se optimizó de acuerdo a la abundancia del transcrito en la raíz. En algunos ensayos la señal no fue observada a concentraciones menores a los 200 ng/ml (Figura 11.A). Por lo que se probó una serie de concentraciones de la sonda, encontrando el rango adecuado de 800 a 1000 ng/ml (Figura 11.B).

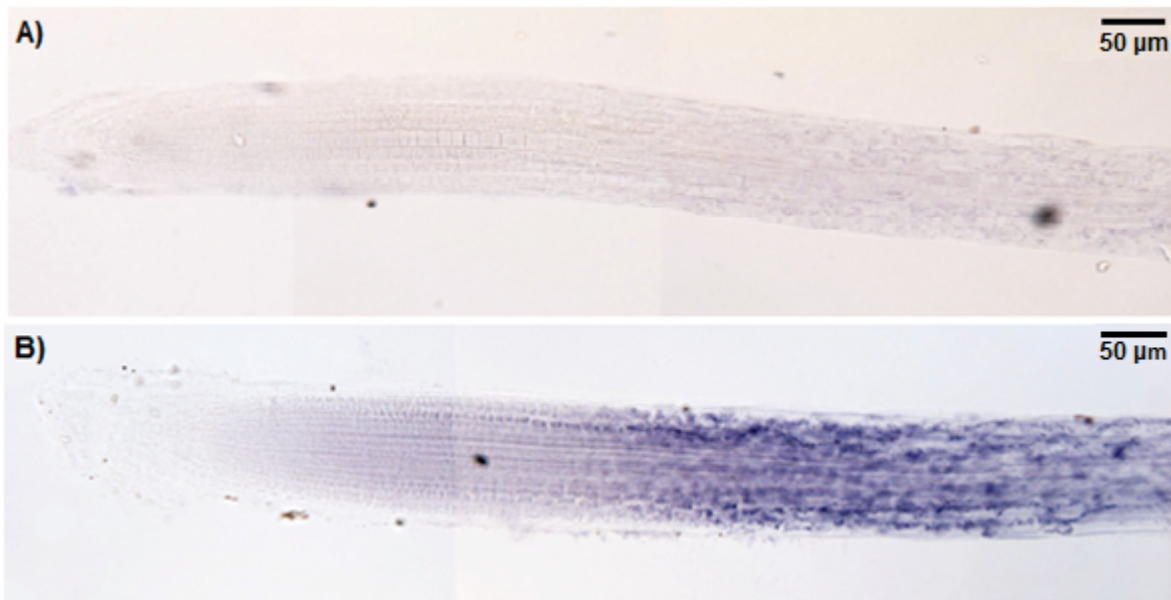


Figura 11. Localización *in situ* del mensajero de *AGL19* con distintas concentraciones de sonda. A) Concentración de 200 ng/ml. B) Concentración de 800 ng/ml.

Debido a que las raíces eran colocadas en tubos eppendorf de 1.5 ml el constante pipeteo en cada lavado o tratamiento, provocaba daño progresivo en el tejido. Por lo que al final de la técnica las raíces se encontraban quebradas y/o rotas (Figura 12.A), llegando a perder frecuentemente la zona meristemática. En caso de estar presente, se encontraba desprovista de la columela y la cofia lateral (Figura 12.B). Fue común el adelgazamiento de la región de transición entre la zona meristemática y la zona de elongación, por lo que el grosor de las raíces fue diferente a lo largo del eje apico-basal del tejido (Figura 12.C). El maltrato al tejido también afectó los resultados de la hibridación *in situ*, debido a que

regiones de la raíz que presentaban daño en su estructura como fragmentación o quebramiento mostraron señal (Figura 12.D). Así mismo, en numerosos ensayos no se logró obtener información de las raíces laterales dado que estas se perdían durante el procedimiento.

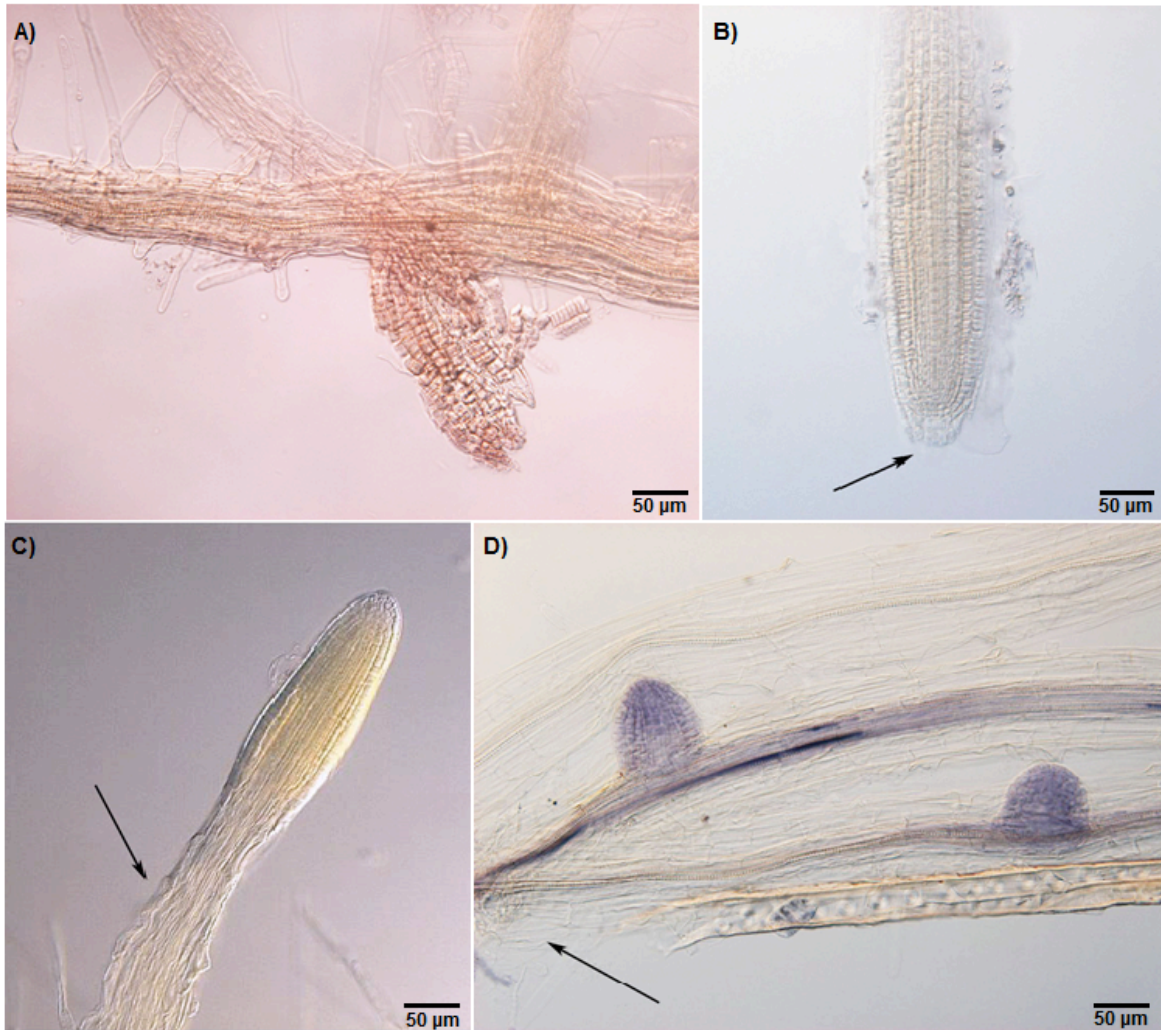


Figura 12. Daño estructural en la raíz producido durante los lavados de la técnica de hibridación *in situ*. A) Raíz quebrada. B) Desprendimiento de la cofia lateral y células de la columela. C) Adelgazamiento de la zona de transición. D) Señal de expresión en zona de la raíz dañada.

Con el objetivo de evitar este daño celular al tejido y facilitar el manejo de las muestras, las raíces fueron colocadas en portaobjetos comerciales cargados positivamente, lo cual aunado a la fijación con PFA en MTSB incrementó en un 100% la estabilidad en la estructura celular de las raíces durante toda la técnica (Figura 13).

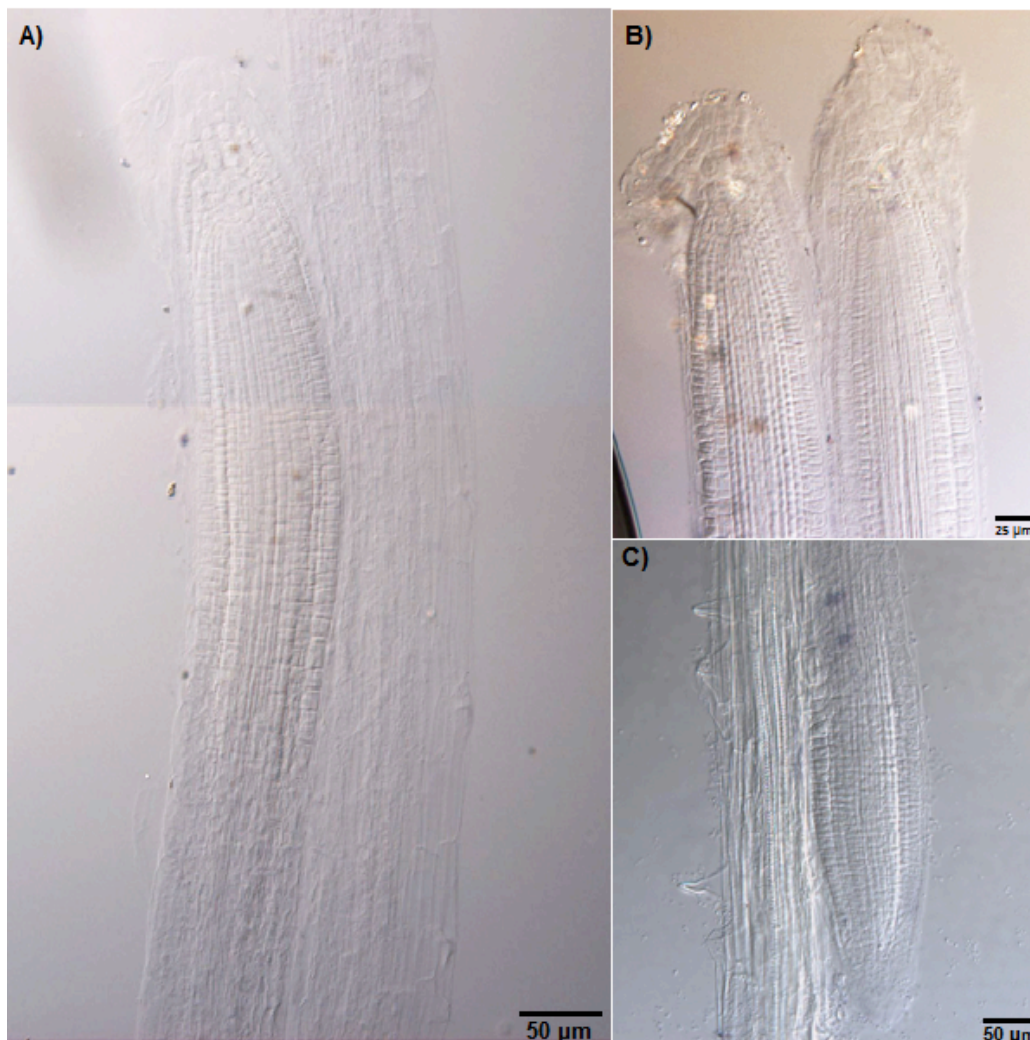


Figura 13. Raíces obtenidas con el método de WISH sin sonda, estandarizado en el presente estudio para la localización de transcritos en raíces de *Arabidopsis thaliana*, en donde es posible apreciar la integridad celular del tejido. A) Raíz principal desde la zona meristemática hasta la zona de elongación. B) Células de la cofia lateral y columela integra. C) Raíz lateral.

Finalmente, la detención de la reacción de la fosfatasa alcalina se realizó con PBS y no con etanol (utilizado en el protocolo de Hejátko *et al.*, (2006) debido a que en numerosas ocasiones el solvente eliminó toda la señal del tejido.

Después de las pruebas y cambios realizados se logró estandarizar un método de WISH para tejidos de raíz que se resume en la figura 14.

Protocolo de Hibridación *in situ* “whole mount” para la detección de transcritos en raíces de *Arabidopsis thaliana*

Fijación del material

- 1.- Las plántulas completas son fijadas por 10 min en vacío y 50 min en movimiento a 4 °C.
- 2.- Las muestras se enjuagan en MTSB 1X, 10 min.
- 3.- Dos lavados en PBS 1X, 10 min.
- 4.- Dos lavados en PBS 1X, 5 min.
- 5.- Un lavado en agua, 5 min.
- 6.- Adherir las muestras a los portaobjetos cargados, dejar a temperatura ambiente máximo 48 horas. Posteriormente colocar a 4 °C por un tiempo máximo de dos semanas.

Permeabilización en hibridación

- 7.- Permeabilizar las muestras con Citrisolv-Etoh 1:1, 30 min.
- 8.- Fijación de las muestras, 20 min a temperatura ambiente.
- 9.- Lavar dos veces con PBT, 10 min.
- 10.- Digestión con Proteinasa K [125 µg/ml] 15 minutos a temperatura ambiente.
- 11.- Parar la digestión con Glicina [2 mg ml⁻¹] en PBS, 5 minutos.
- 12.- Dos lavados (rápido, 10 min) con PBT.
- 13.- Fijación de las muestras, 20 min a temperatura ambiente.
- 14.- Lavar dos veces (rápido, 10 min) con PBT.
- 15.- Lavar en solución de hibridación, 10 min.
- 16.- Prehibridación por una hora a 55° en movimiento.
- 17.- Hibridación por 16 horas a 55 °C en solución de hibridación con 1 µg/ml de sonda sentido (control) o antisentido y 150 ng/ml de tRNA (desnaturalizar la sonda a 65°C por 5 minutos).

Lavados de las muestras

- 18.- Lavar las muestras tres veces (rápido, 60 minutos y 20 minutos) con Formamida 50%/ SSC 2X / Tween-20 0.1% a 55°C.
- 19.- Lavar con SSC 2X / Tween-20 0.1%, 20 min a 55°C
- 20.- Lavar dos veces con SSC 0.2X / Tween-20 0.1%, 20 min a 55°C
- 21.- Lavar dos veces con SSC 0.1X / Tween-20 0.2%, 20 min a 55°C
- 22.- Lavar con PBT, 10 min a temperatura ambiente.
- 23.- Preabsorber el anticuerpo Anti-DIG-AP 1:1500 en PBS 1X/Tween-20 0.1%/BSA 1% por 3 horas a 4°C
- 24.- Incubar las muestras con el anticuerpo 1:1500, 2:30 h en oscuridad

Lavados y detección

- 25.- Lavar cuatro veces con PBT, 20 min.
- 26.- Incubar en amortiguador de detección por 10 min
- 27.- Colocar las muestras en 2.25 µl NBT/ml, 1.17BCIP/ml, 2mM/ml Levamisol por cada mililitro de amortiguador de detección, en oscuridad.
- 28.- Observar frecuentemente el material, detener la reacción hasta observar un fondo rosado con cuatro lavados rápidos de PBS.
- 29.- Colocar las muestras en glicerol 50%/ PBS.
- 30.- Aclarar las muestras durante 15 minutos en solución de aclaramiento y proceder con el análisis microscópico.

Figura 14. Protocolo estándar de WISH para raíces de *Arabidopsis thaliana*

7.2 Análisis de expresión del gen *AGL19* y *XAL2/AGL14* en la raíz de *Arabidopsis thaliana*

7.2.1 La expresión de *AGL19* y *XAL2/AGL14* incrementa con el tiempo de desarrollo de la raíz.

Se ha reportado que los genes *AGL19* y *XAL2/AGL14* comparten una gran identidad a nivel de secuencia (Figura 5 y 6) y una fuerte expresión de sus mensajeros en raíz (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000b, Rounsley *et al.*, 1995); por lo que previo a analizar la expresión espacial de *AGL19* en este tejido, se estudió la expresión temporal por RT-PCR de *XAL2/AGL14* con respecto a la de *AGL19*, con la finalidad de determinar un tiempo de desarrollo en el cual la probabilidad de hibridación cruzada entre ambos mensajeros sea menor. Para ello, se realizó una cinética de expresión temporal de *AGL19* y *XAL2/AGL14* en la raíz de plántulas silvestres de 5, 7 y 9 dps mediante un análisis de RT-PCR.

La expresión de *AGL19* en las raíces de plántulas de 5 dps es muy débil, llegando a ser detectada a más de 35 ciclos de amplificación; a los 7 dps la cantidad de mensajero es mayor, reportándose en este ensayo la expresión más alta a los 9 días (Figura 15.A); lo cual sugiere que la expresión de *AGL19* se incrementa con el tiempo de desarrollo.

La abundancia de mensajero de *XAL2/AGL14* al igual que la de *AGL19*, incrementa con el tiempo de desarrollo, alcanzando los niveles de expresión más altos a los 9 días de crecimiento (Figura 15.B); sin embargo, la expresión de *XAL2/AGL14* es mayor respecto a la expresión de *AGL19* en los tres tiempos analizados.

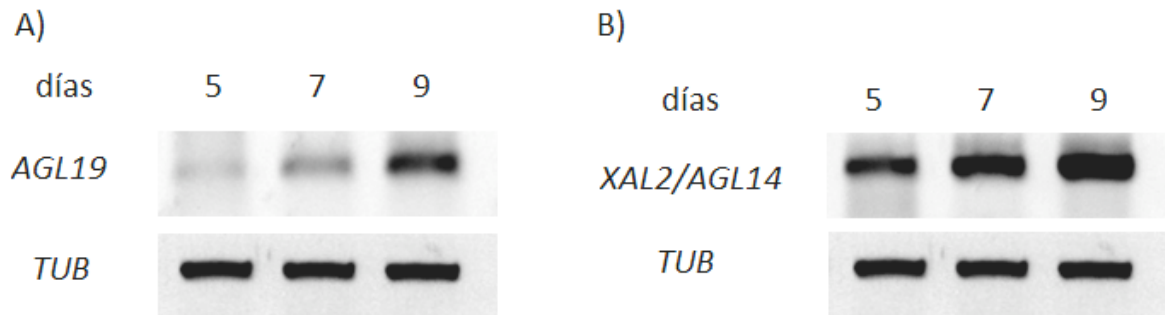


Figura 15. Cinética de expresión por RT-PCR semi-cuantitativo en la raíz de *Arabidopsis thaliana*. A) Expresión de *AGL19*. B) Expresión de *XAL2/AGL14*. En ambos casos se amplificó el gen de *TUBULINA2* como control interno.

Con estos resultados se corroboró la expresión de *AGL19* y *XAL2/AGL14* en la raíz; no obstante, debido a que la expresión de *XAL2/AGL14* es constante en todos los tiempos estudiados, no obtuvimos un comportamiento de expresión diferencial entre ambos genes que nos ayudara a evitar reacción cruzada en los ensayos de hibridación *in situ*. Por ello, para determinar la expresión espacial de *AGL19* se optó por usar raíces de plantas de 7 días que son más fácil de manejar por su tamaño y en donde *AGL19* tiene una expresión intermedia y no se presenta un pico máximo de expresión de *XAL2/AGL14*.

7.2.2 El mutante *agl19-3* y *xal2-2* son controles útiles para determinar la expresión de *AGL19* en la raíz.

Debido a que la expresión de *XAL2/AGL14* es constante y mayor a la de *AGL19* en las diferentes etapas del desarrollo de raíz analizadas en este estudio, fue necesario utilizar líneas mutantes como controles negativos para realizar los ensayos de hibridación *in situ*. Para ello, se usaron las mutantes *agl19-3* y *xal2-2* de pérdida de función de *AGL19* y *XAL2/AGL14* respectivamente, previamente genotipificadas (Cruz-Sánchez, tesis doctoral

en proceso y Garay-Arroyo *et al.*, datos no publicados). En un principio se estudió la expresión a nivel de mensajero de estos genes en las plantas *agl19-3* y *xal2-2*.

El análisis por RT-PCR determinó que el mutante *agl19-3* muestra una expresión de *AGL19* considerablemente menor respecto a las plantas control (Figura 16.A). Resultados similares fueron observados para el gen *XAL2/AGL14* en el mutante de *xal2-2* (Figura 16.B). En ambos mutantes se observa una ligera expresión de *AGL19* o *XAL2/AGL14* respectivamente, por lo que los mutantes no son completamente nulos; sin embargo, al ser de muy baja expresión sí se pueden usar como controles para determinar la especificidad de la señal generada en los ensayos de hibridación *in situ*.

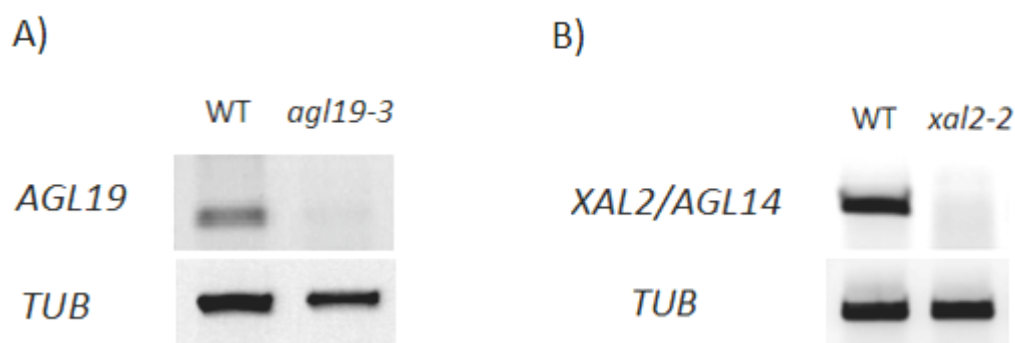


Figura 16. Análisis de abundancia del mensajero de *AGL19* y *XAL2/AGL14* en las raíces de plantas silvestre (WT) y líneas mutantes de 7 días post siembra. A) mutante *agl19-3*. B) mutante *xal2-2*.

7.3 Patrón de expresión espacio-temporal del gen *AGL19* en la raíz

7.3.1 La sonda de ARNm para *AGL19* fue diseñada en la región con menor similitud a la secuencia de *XAL2/AGL14*.

Previo al ensayo de hibridación *in situ* se realizó un análisis informático de la sonda de ARNm *AGL19* con la finalidad de conocer su especificidad. El diseño de la sonda tanto en

secuencia, longitud y contenido de bases nitrogenadas de Guanina (G) y Citosina (C) son variables que deben ser cuidadosamente analizadas para garantizar la fiabilidad de los resultados de hibridación *in situ*. En particular, su especificidad es un punto crítico en la técnica. Sondas que presenten regiones similares en secuencia a otros genes, producirán una señal inespecífica resultado de hibridaciones cruzadas o detecciones de genes que no son de interés.

Para este trabajo en un principio se pensó en diseñar una sonda de ARNm de *AGL19* en la región 3' UTR, con la finalidad de que ésta pudiera ser más específica y no hibridara con *XAL2/AGL14*; sin embargo, la región UTR solo presenta alrededor de 30 nucleótidos de longitud, por lo que fue necesario diseñar la sonda en la región codificante del gen. Análisis comparativos de similitud de cuatro regiones de *AGL19* respecto a *XAL2/AGL14*, dedujeron que la región III tiene una similitud menor (73%) respecto a las otras regiones de ambos genes (Figura 17). Por ello la sonda de ARNm *AGL19* fue diseñada específicamente dentro de esta región que corresponde a el dominio K y Carboxilo de *AGL19* (Pérez-Ruíz, datos no publicados) (Figura S3; Anexos). A pesar de que la sonda tiene menor identidad (63.8 %.), no es una zona ideal para el diseño de una sonda específica para *AGL19*; sin embargo, dada la gran identidad a nivel de sus secuencias de pares de bases, resulta imposible diseñar una sonda que no pueda hibridar con el mensajero *AGL14/XAL2*.

```

AGL19      ATGGTGAGGGGC AAAACGAGATGAAGAGGATAGAGAACGCAACAAGCAGGCAAGTGACG
AGL14      ATGGTGAGGGG AAAAGACAGAGATGAAGAGGATAGAGAACGCAACGAGCAGGCAAGTGACT

AGL19      TTTTCGAAGAGAAGAAAATGGACTCTTGAAGAAAAGCCTTCGAATTATCGGTCTTTGTGAT
AGL14      TTCTCAAAAAGAAAGAAAATGGACTTTTGAAGAAAAGCCTTTCGAATTATCAGTCTTTGTGAT

AGL19      GCTGAAGTTGCTTTGGTTATCTTCTCTCCAAGATCCAACTCTATGAGTTCTCTAGCTCT
AGL14      GCTGAAGTTGCCCTAATCATCTTCTCTCTAGAGGCAAACCTCTATGAGTTCTCTAGCTCC

AGL19      ---AGTATAGCAGCAACAATTGAACGCTATCAGAGACGAATAAAAGAAAATTGGGAATAAT
AGL14      TCCAGTATACCTAAAACAGTAGAAAGATATCAAAGCGAATACAAGATCTCGGGTCTAAC

AGL19      CATAAGAGAAATGATAATTCTCAGCAAGCGAGAGACGAAACATCTGGATTGACAAAAAG
AGL14      CATAAGAGAAATGATAATTACAGCAATCGAAGGACGAAACCTATGGCTTGGCGAGAAAG

AGL19      ATTGAACAGCTAGAGATATCTAAACGAAAATTGCTTGGAGAAGGCATTGATGCATGTTCC
AGL14      ATCGAACATTTGGAGATTTTCGACACGAAAAATGATGGGAGAAGGACTTGACGCATCTTCT

AGL19      ATCGAGGAGCTGCAACAGTTAGAGAATCAGTTGGACC GAAGCTTGAGCAGGATAAGAGCC
AGL14      ATAGAAGAGTTACAACAATTTGGAGAACCAGTTGGACAGAAGCTTAATGAAAATAAGAGCC

AGL19      AAGAAGTACCAATTACTCCGTGAAGAAATTGAGAAGTTGAAGGCAGAGGAGAGGAATCTC
SONDA      TTGAGAAGTTGAAGGCAGAGGAGAGGAATCTC
AGL14      AAAAAGTACCAGTTATTACGAGAAGAACTGAGAAATTTAAAAGAAAAGGAGAGGAACCTC
                ***** * * * * * ***** * * *

AGL19      GTTAAGGAAAATAAAGATCTGAAGGAGAAGTGGCTTGAATGGGAACAGCAACAATAGCA
SONDA      GTTAAG-AAAATAAAGATCTGAAGGAGAAGTGGCTTGAATGGGAACAGCAACAATAGCA
AGL14      ATTGCAGAAAATAAATGCTGATGGAGAAGTGTGAGATGCAAGGAAGAGGAATAATAGGA
                **      *****      **** *****      **** * * * * *

AGL19      TCATCACAATCAACGTTATCATCATCAGAAGTGAACATAGATGACAAT---ATGGAAGTG
SONDA      TCATCACAATCAACGT
AGL14      AGAATATCATCATCATCAACATCAGAACTGGATATAGATGACAATGAAATGGAAGTG
                * * * * *

AGL19      GAGACTGGTTTGTTTCATGGACCTCCTGAGACAAGACAATCCAAAAAATTCCTCTCA
AGL14      GTGACTGATTTGTTTCATGGACCTCCTGAGACTCGACTTCAAAAAGTTTCTCTCA

AGL19      AATTAA
AGL14      AACTAA

```

Figura 17. Alineamiento de diferentes regiones del gen y de la región donde fue diseñada la sonda de ARNm de AGL19. Identidad: **Región I** 88.83 %, **región II** 75.71 %, **región III** 73.89 %, **región IV** 76.19 % y región de la sonda 63.8 %.

7.3.2 El producto generado por transcripción *in vitro* corresponde a la sonda de ARNm de *AGL19*.

La sonda de ARNm de *AGL19* fue sintetizada por transcripción *in vitro*, con las ARN polimerasas específicas de los sitios promotores T7 o SP6. Para ambos casos la reacción generó un transcrito de mayor concentración que corresponde al tamaño esperado (Figura 18.A), por lo que se dedujo que estos productos correspondían a la sonda de ARNm de *AGL19* sentido (SP6) y antisentido (T7).

Para comprobar que los transcritos correspondían específicamente a las sondas del gen *AGL19*, se sintetizó el ADNc de las muestras con los oligonucleótidos específicos de la misma. El amplificación de mayor concentración tenía un peso de alrededor de 120 pb, tamaño aproximado a la sonda de ARNm de *AGL19* de 108 pb (Figura 18.B), por lo que se comprobó que el ARNm sintetizado por ambas ARN polimerasas corresponde al transcrito de *AGL19*. Estos transcritos se utilizaron como sonda en la técnica de WISH.

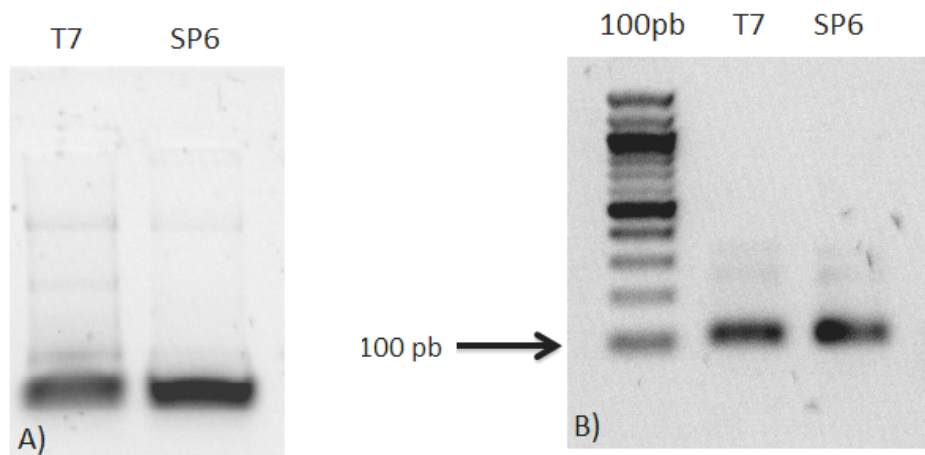


Figura 18. Sondas de ARNm de *AGL19* Sentido (SP6) y Antisentido (T7). A) Productos generados por transcripción *in vitro*. B) ADNc de las sondas de ARNm de *AGL19*.

7.3.3 La expresión del mensajero *AGL19* muestra un patrón diferencial a lo largo del eje apico-basal de la raíz de plantas silvestres.

Con las condiciones anteriormente estandarizadas se realizaron los ensayos de hibridación *in situ* en raíces de 7 dps para determinar la expresión del ARNm de *AGL19*. Los resultados obtenidos muestran que *AGL19* se expresa en células de la epidermis, córtex y haz vascular, caracterizando un patrón de expresión diferencial a lo largo del eje apico-basal de la raíz (Figura 19).

En plantas silvestres, en la región extremo apical de la raíz, específicamente en las células de la columela y cofia lateral no es posible observar señal. En el centro quiescente así como en células aledañas a este, la expresión tampoco fue detectada; en contraste a estos resultados, en la zona meristemática sí es posible observar expresión en las células del córtex, endodermis; particularmente esta señal es más fuerte en las células del haz vascular (Figura 19.A).

La transición entre la zona meristemática y la zona de elongación delimita un incremento en la señal de expresión. La débil expresión observada en los límites de la zona meristemática incrementa conforme las células se empiezan a elongar mostrando un incremento de expresión gradual, en esta zona de elongación la expresión se observa en la epidermis, córtex y haz vascular (Figura 19.A). La señal observada en la zona de elongación decrece hasta desaparecer en la zona de diferenciación.

Por otra parte, en las plantas silvestres hibridadas con la sonda sentido (control negativo) (Figura 19.D), no se observa señal en la zona meristemática; sin embargo, en la zona de elongación se logra observar una ligera señal pero mucho menor respecto a la señal observada con la sonda antisentido (comparar figura 19.A y D), lo que sugiere que en la zona de elongación existe una ligera inespecificidad.

En la zona de elongación, es posible observar un patrón de polarización de la señal. Esta señal parece estar localizada en la región citoplasmática celular, delimitando un patrón

definido de orientación acropetala, señal que desaparece gradualmente conforme algunas células epidérmicas comienzan a diferenciarse en pelos radiculares (Figura 20.A y B). Particularmente en la figura 20.B es posible observar señal de expresión entre dos células elongadas, lo que podría parecer un transporte de una célula a otra. El movimiento intercelular de los factores de transcripción ya ha sido reportado anteriormente, en particular el transporte simplástico de ARNs mensajeros y de interferencia (Kurata *et al.*, 2005). Sin embargo, en este caso en particular, esta aseveración debe ser analizada y estudiada con más detalle para definir si *AGL19* presenta este tipo de transporte.

Por otra parte, el patrón de expresión observado en raíces primarias es similar al de las raíces laterales. En los primordios de las raíces laterales la señal es ligera e incrementa conforme el desarrollo de la raíz (Figura 21.A), la cual finalmente muestra un patrón de expresión similar al de la raíz principal, encontrando la mayor expresión en la zona de elongación (Figura 21.B).

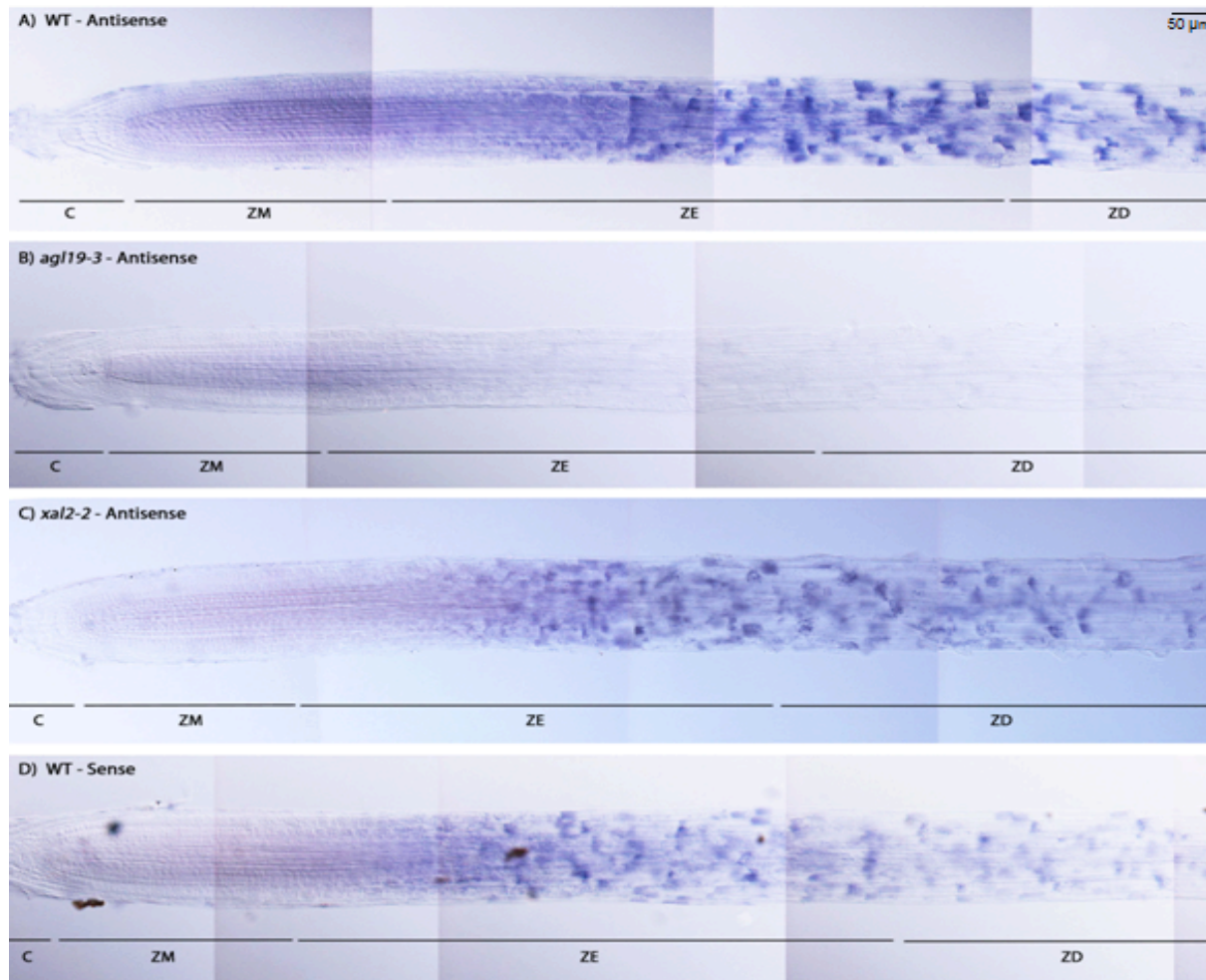


Figura 19. Localización espacio-temporal del gen *AGL19* en la raíz. A) Planta silvestre, sonda antisentido. B) Mutante *agl19-3*, sonda antisentido. C) Mutante *xal2-2*, sonda antisentido. D) Plantas silvestre, sonda sentido.

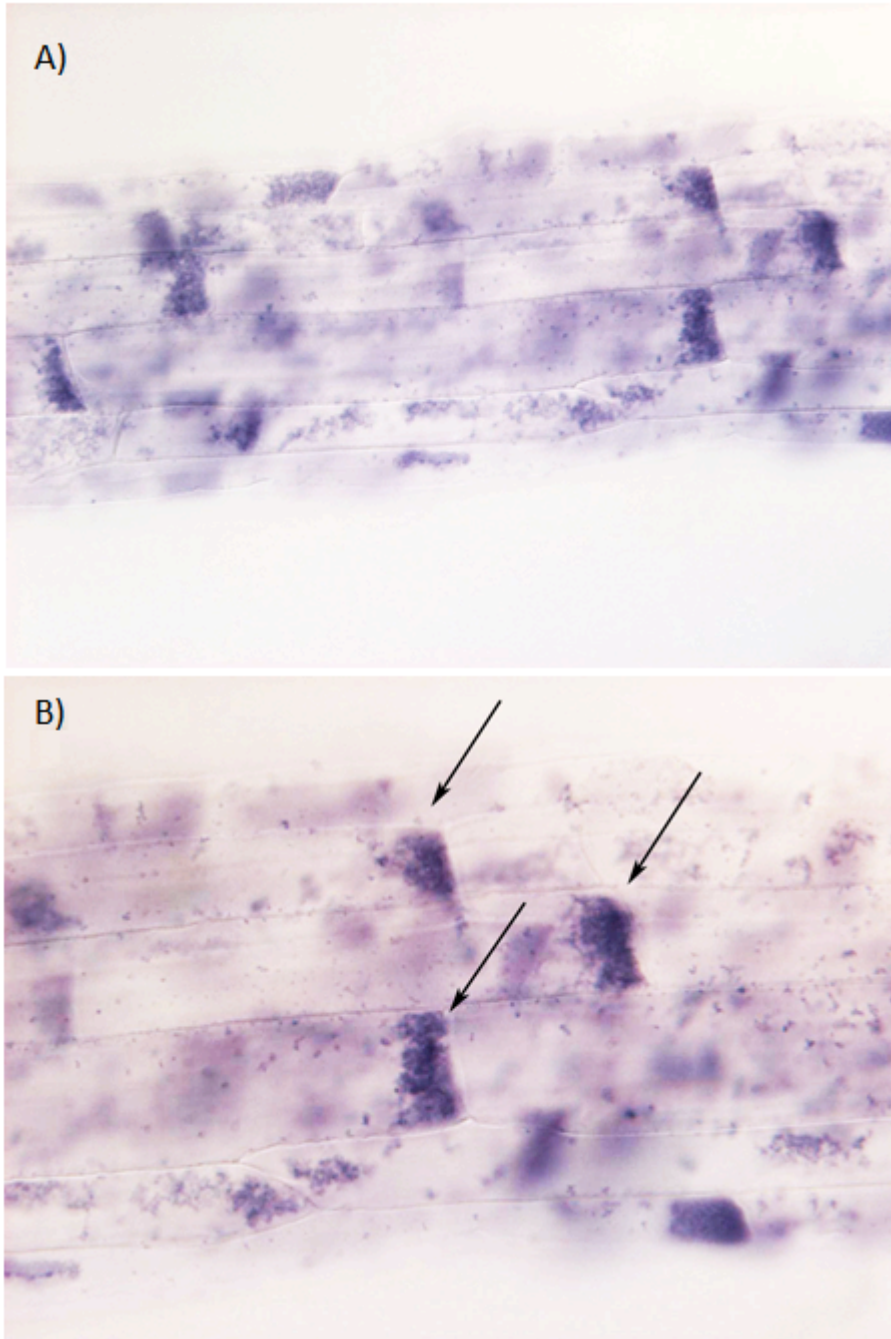


Figura 20. Polarización de la señal de expresión de AGL19 en las células de la zona de elongación.
A) 20X. B) 60X



Figura 21. Localización espacio-temporal del gen *AGL19* (Sonda antisentido). Planta silvestres: A) Primordio de raíz lateral. B y C) Raíz lateral planta *agl19-3*: D) Primordio de raíz lateral. E) Raíz lateral.

7.3.4 La señal de expresión en los mutantes *agl19-3* y *xal2-2* complementa el patrón de expresión observado en plantas silvestres.

Con el fin de comprobar si la señal de expresión observada en la raíz de plantas silvestres corresponde a la localización del mensajero de *AGL19* y que no da reacción cruzada con *XAL2/AGL14*, se realizó la hibridación *in situ* en plantas mutantes *agl19-3* y *xal2-2*.

En el mutante *agl19-3* solo se observó una débil señal en la zona meristemática, mientras que en la zona de elongación no se observó señal de expresión o está era muy baja (Figura 19.B). Los controles realizados con la sonda sentido en raíces *agl19-3* presentaron una señal muy débil, siguiendo el mismo patrón de expresión observado en la figura 19.B. Estos resultados refuerzan que el patrón de expresión de *AGL19* observado en plantas silvestres es específico.

Debido a que existe una alta probabilidad de que la señal observada en los ensayos de hibridación *in situ* corresponda a la expresión de *AGL19* y *XAL2/AGL14* (dada la identidad que existe entre estos genes), se realizó la localización espacio-temporal de *AGL19* en plantas mutantes *xal2-2*.

En general la señal de expresión de *AGL19* en las mutantes *xal2-2* es menor respecto a la observada en plantas silvestres, mostrando una disminución mayor de la señal en la zona meristemática respecto a la zona de elongación (comparar Figura 19 A y C). Esta diferencia en expresión puede ser debido a: 1) que la señal de *AGL19* observada en plantas silvestres es la suma de la expresión de *AGL19* y *XAL2/AGL14* o 2) que la expresión de *AGL19* disminuye en mutantes *xal2-2*.

Estudios realizados con las mutantes *xal2-2* sugieren que se trata del segundo caso, ya que por una parte, estas mutantes tiene una reducción en el tamaño de la zona meristemática y de elongación respecto a las plantas silvestres (Garay-Arroyo *et al.*, datos no publicados), la reducción de estas zonas pueden disminuir el espacio de expresión de *AGL19*. Además, ensayos de hibridación por RT-PCR *in situ* indican que la expresión *XAL2/AGL14* se presenta en las células de la columela, en la cofia lateral, en epidermis, en cilindro

vascular de la zona diferenciada y en primordios de las raíces laterales (Garay Arroyo *et al.*, , datos no publicados), por lo que en la zona meristemática y en la zona de elongación la expresión de *XAL2/AGL14* solo puede coincidir en la epidermis de la zona de elongación y no en el resto de las células donde se observa la señal de *AGL19*. Lo anterior sugiere que la señal de expresión observada con la sonda de *AGL19* podría ser específica para este gen y no dar reacción cruzada con *XAL2/AGL14*.

Los controles *xa12-2* hibridados con la sonda sentido mostraron una señal igual o ligeramente mayor con respecto a la observada en los ensayos realizados con la sonda sentido en plantas silvestres (Figura 19.D), por lo que en estos ensayos hay una inespecificidad de la señal observada con la sonda sentido.

Sin embargo, la presencia de señal en controles de hibridación *in situ* utilizando la sonda sentido ya ha sido reportada, por lo que estos resultados deben ser cuidadosamente analizados; no obstante se ha sugerido que para el estudio de la expresión génica se utilicen como controles negativos los mutantes de pérdida de función del gen de interés (Hejatko *et al.*, 2006).

8. Discusión

8.1 Estandarización de la técnica de WISH para la localización de transcritos en raíz

Con la finalidad de analizar la expresión de los genes MADS-box en la raíz, se han empleado distintos métodos de análisis de expresión génica como los de RT-PCR y Northern blot; sin embargo, tales técnicas no ofrecen información acerca de la expresión espacial de los genes. Por lo que, últimamente se han empleado técnicas de localización *in situ* de transcritos como las de WISH; no obstante, el maltrato al tejido durante la técnica ha sido un obstáculo que dificulta la obtención de resultados.

La estandarización de la técnica de WISH realizada en este estudio, para la localización de transcritos en la raíz de *Arabidopsis thaliana*, requirió de varias modificaciones al protocolo publicado por Hejártko *et al.*, (2006). Los cambios realizados en este trabajo han mejorado de forma sustancial los problemas de señal inespecífica y maltrato al tejido

La fijación química del tejido de raíz fue primordial para la optimización de la técnica. Dado que conservar la estructura y composición química celular es esencial para la fiabilidad de los resultados, en este caso la localización de moléculas de ARN, la fijación del tejido debe ser efectiva. La fijación con aldehídos como el PFA es una buena opción debido a la gran accesibilidad y retención del ARN celular (Wilkinson 1998). Sin embargo en este estudio observamos que la composición del amortiguador de la solución de fijación también es importante, dado que el mantenimiento en la integridad del tejido de raíz fue mucho mayor sustituyendo el amortiguador PBS por MTSB como disolvente del PFA.

El MTSB está compuesto de PIPES. Este amortiguador ha sido ocupado frecuentemente en la fijación de tejidos, dado que incrementa la retención de los filamentos de actina del citoesqueleto celular. También se ha reportado su capacidad para retener materiales celulares y reducir la pérdida de lípidos, especialmente de aquellos de la membrana

plasmática (Hayat 2000). Por lo que, la preservación de la estructura celular fue considerablemente mayor en comparación a la obtenida con el amortiguador de fosfatos salino (PBS), el cual frecuentemente ha sido utilizado en las técnicas inmunocitoquímicas. Otro factor importante en la conservación del tejido fue su inmovilización. La colocación del tejido en tubos durante la técnica de WISH generaba daño mecánico sobre las raíces. El uso de portaobjetos especiales para inmunocitoquímica permitió la realización del experimento con las raíces inmovilizadas, obteniendo con ello tejidos íntegros.

Con la finalidad de mejorar las condiciones de la hibridación se optimizó la concentración de la sonda de ARN. Altas concentraciones (de hasta 1 µg) dieron mejores resultados, debido a la baja abundancia del transcrito de *AGL19*, ya que es conocido que la expresión de los factores transcripcionales es baja en comparación a genes de tipo “*housekeeping*” o de alta expresión. Por otro lado las hibridaciones de ARN:ARN requieren mayores concentraciones de sonda en comparación con la hibridación realizada utilizando sondas de ADN (Wilkinson 1998).

El número de lavados fue uno de los puntos más importantes para evitar la gran cantidad de señal inespecífica o “background”. Dado que se utilizó una concentración alta de sonda, se esperaba obtener una cantidad de señal inespecífica mucho mayor a la observada en ensayos control sin sonda, por lo que se incrementó el número de lavados posteriores a la hibridación. Sin embargo, de mayor prioridad fue la optimización de la concentración y el tiempo de incubación del anticuerpo Anti-DIG-AP. Ambos puntos (concentración y el tiempo de incubación) fueron determinantes para evitar la gran cantidad de señal inespecífica en los ensayos de hibridación *in situ*.

En particular, la detección de la sonda es un punto de la técnica que también debe ser analizado dado que se existen distintos métodos de detección. En el caso de las sondas marcadas con digoxigenina, la detección puede ser realizada con la enzima peroxidasa (PO) y/o con fosfatasa alcalina (AP). Ambas enzimas se emplean en tejidos de plantas, a pesar de que puede haber señal por actividad de enzimas endógenas; sin embargo, la detección con Anti-DIG-AP es el método frecuentemente utilizado, debido a su alta

estabilidad. En el presente trabajo también se realizó la detección con la enzima peroxidasa, no obstante este método produjo una gran cantidad de señal, llegando a saturar el tejido lo que imposibilitó el análisis de las muestras.

Por lo tanto, es importante mencionar que para obtener resultados fiables acerca del análisis de expresión en un determinado tipo de tejido, la estandarización de métodos de análisis de expresión como el de hibridación *in situ* debe ser realizada bajo la constante prueba de ensayo y error con la finalidad de determinar el rango óptimo de las variables anteriormente mencionadas y modificadas en este estudio. El cambio de estas variables depende básicamente del tipo de tejido a trabajar y de las características del gen a estudiar incluyéndose su grado de homología con otros genes y su abundancia.

8.2 Patrón de expresión espacio-temporal de AGL19.

La expresión de *AGL19* se da principalmente en raíz, mientras que en otros tejidos su expresión es nula o muy baja (Schonrock *et al.*, 2006, Villajuana 2006) lo que sugiere que este gen podría estar implicado en algún proceso que se lleve a cabo durante el desarrollo de la raíz. Esta hipótesis es reforzada por los análisis preliminares que se han hecho con el mutante de pérdida de función *agl19-3*, el cual presenta raíces ligeramente más cortas y con un desarreglo en su estructura celular (datos por corroborar).

Los resultados obtenidos en el análisis de expresión semicuantitativa por RT-PCR indican que la expresión de *AGL19* tiene una relación directamente proporcional al tiempo de desarrollo de la raíz, es decir se incrementa conforme avanza el desarrollo de la raíz. Un patrón similar pero de mayor intensidad se observó en *XAL2/AGL14*, gen que comparte una alta similitud con *AGL19*. Estos patrones de expresión sugieren que ambos genes se requieren desde etapas tempranas hasta etapas tardías del desarrollo radicular.

A pesar de la gran identidad en secuencia y en expresión temporal que tienen ambos genes, su función no es redundante ya que la pérdida de función por separado de cada uno de estos genes (mutantes *agl19-3* y *xal2-2*) provoca un fenotipo diferente en la raíz, además análisis más detallados del gen *XAL2/AGL14* sugieren que los mecanismos de

acción de cada gen van por vías diferentes (datos por corroborar y Garay *et al.*, datos no publicados).

La comparación entre el patrón de expresión *in situ* en mutantes *xal2-2* y *agl19-3* con respecto al de plantas silvestres, parece indicar que la señal observada en la raíz de plantas silvestres es específica para *AGL19* y que la baja señal observada en el mutante de *xal2-2* se debe a que este mutante tiene disminuida la expresión de *AGL19*. Análisis de expresión por RT-PCR realizados en plantas mutantes (Hernández-Marroquín, tesis de maestría en proceso), muestran una regulación positiva entre ambos genes, ya que en mutantes *agl19-3* la expresión de *XAL2/AGL14* es muy baja, mientras que en plantas *xal2-2* la expresión de *AGL19* es casi nula.

El que ambos genes presenten funciones diferentes y una expresión temporal similar indica que su expresión espacial podría ser diferente. En efecto, el patrón de expresión espacial de *AGL19* observado se concentra básicamente en el córtex, endodermis y en el haz vascular de la zona meristemática y con mayor magnitud en todas las células (epidermis, cortex y haz vascular) de la zona de elongación. En la zona de diferenciación solo se observa en los primordios de las raíces laterales. En tanto que análisis de RT-PCR hibridación *in situ* (Garay-Arroyo *et al.*, Datos no publicados), indican que la expresión de *XAL2/AGL14* se presenta en las células de la columela, en la cofia lateral, en epidermis, en cilindro vascular de la zona diferenciada y en primordios de las raíces laterales, por lo que ambos genes solo se coexpresan en la epidermis y los primordios de las raíces laterales, en los demás tejidos su expresión es diferencial.

El patrón de expresión de *AGL19* obtenido en este trabajo contrasta con lo reportado por Alvarez-Buylla *et al.*, (2000b). En donde se describe la expresión de *AGL19* en la región meristemática de la raíz, así como también en células de la columela y cofia lateral. Por lo que probablemente la expresión reportada por Alvarez-Buylla, al menos en parte pertenezca a la expresión de *XAL2/AGL14*, dado que el patrón descrito coincide casi en su totalidad al observado para este gen (Garay-Arroyo *et al.*, datos no publicados).

En contraste a los ensayos realizados anteriormente para el análisis de expresión espacio-temporal de *AGL19*, la sonda utilizada en este trabajo fue más específica para este gen,

dado que la región utilizada para su síntesis presentaba el menor índice de identidad entre ambas secuencias, aunado al hecho de que la estandarización de la técnica eliminó en su totalidad la señal inespecífica. Sin embargo, se deben de hacer más análisis de expresión *in situ* por el método de WISH con una sonda específica para *XAL2/AGL14*, este gene tiene una región 3' UTR no traducible relativamente más grande respecto a la de *AGL19* con la que se puede obtener una sonda específica para poder contrastar los resultados obtenidos en este trabajo con la expresión de *XAL2/AGL14* en los mismos estadios de desarrollo de las plantas.

8.3 Patrón de expresión y función de *AGL19*.

El fenotipo de la raíz de *agl19-3* sugiere que este gen participa en la regulación del crecimiento de este órgano. Como se mencionó anteriormente el crecimiento de la raíz depende exclusivamente de dos factores: la tasa de proliferación celular en la zona meristemática y la tasa de diferenciación celular.

Debido a que en plantas mutantes de *AGL19* es evidente una reducción en tamaño de la raíz, en particular se ha reportado una disminución en tamaño de la zona de elongación, (fenotipo observado en mutantes por transposon (Ochoa-Espinosa, 2002)) todo parece indicar que este gen podría estar realizando su actividad de factor transcripcional en esta región de la raíz. Tal premisa correlaciona con el patrón de expresión del mensajero del *AGL19* observado únicamente en las células elongadas de la epidermis y córtex, tipos celulares en donde este gen podría estar realizando su papel como promotor de la diferenciación celular.

9. Conclusiones

1. La técnica de WISH debe ser optimizada de acuerdo a los objetivos de la investigación y el tipo de tejido a trabajar.
2. La fijación del tejido con PFA disuelto en el amortiguador MTSB, así como modificaciones en el tiempo y concentración del anticuerpo y en el número de lavados astringentes, fueron los puntos determinantes para la estandarización de la técnica de WISH para la localización de transcritos en la raíz de *Arabidopsis thaliana*.
3. Durante el lapso de tiempo de 5 a 9 dps, la expresión de *XAL2/AGL14* en la raíz es mucho mayor en comparación a la de *AGL19*.
4. Los ensayos de WISH parecen indicar que *AGL19* se expresa fuertemente en células del córtex y haz vascular de la zona meristemática, en tanto que la mayor señal de expresión fue observada en células de la epidermis, córtex y haz vascular de la zona de elongación de la raíz.
5. Análisis de expresión de *AGL19* por RT-PCR e hibridación *in situ* en los mutantes *agl19-3* y *xal2-2*, parecen indicar que el patrón de expresión de ambos genes es diferencial a lo largo del desarrollo de la raíz.

10. Perspectivas

Para esclarecer los resultados obtenidos en este trabajo, se podrían realizar ensayos control en doble mutantes *xal2-2/agl19-3*, en tales muestras se comprobaría si la expresión observada en plantas silvestres es específica.

Dado que la sonda utilizada en este estudio no es lo suficientemente específica como para solo determinar únicamente la expresión espacio-temporal del ARNm de *AGL19*, podrían utilizarse distintas técnicas de análisis de expresión génica a nivel transcripcional o de proteína. Construcciones o fusiones de genes reporteros como GFP o GUS al promotor o secuencia completa prevería un importante marco de referencia con respecto a su expresión. Sin embargo lo más conveniente sería realizar la inmunolocalización de las proteínas de ambos factores transcripcionales, con ello no solo se podría descartar la localización cruzada, sino se podría delimitar el sitio de acción de ambos factores transcripcionales.

11. Anexo

Figura S1. Esquema de la estructura genética de *AGL19* y *XAL2/AGL14* (Rectángulos exones y líneas intrones) en donde se muestra el sitio de la inserción del mutante de T-ADN *agl19-3* y el mutante por transposon *xal2* (triángulos).

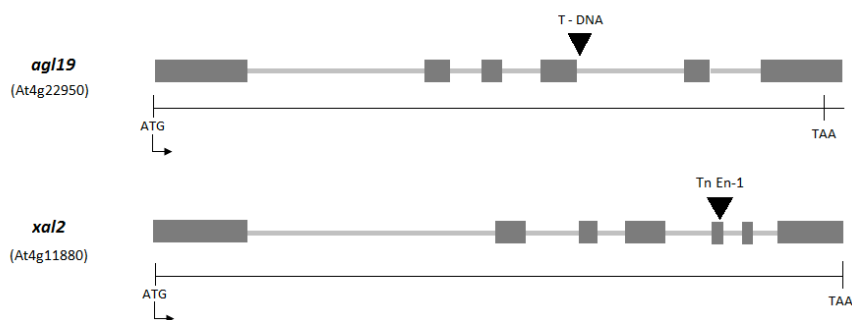
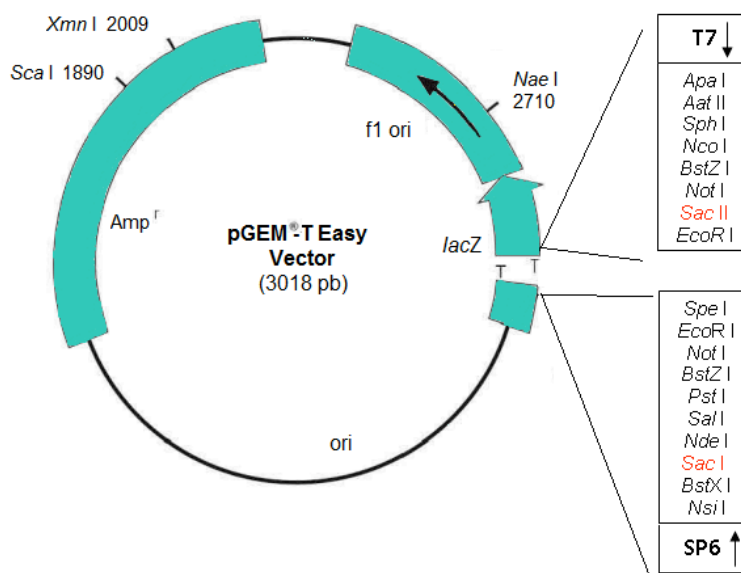


Figura S2. PGEM-T *AGL19*. Vector de clonación de la sonda ARNm *AGL19* y secuencia de la misma.



Fragmentó clonado de 108 pb para sonda de Hibridación in situ

T7 ACGTTGATTG TGATGATGCT ATTGTTGCTG TTCCCATTCC AAGCCACTTC
 TCCTCAGAT CTTTATTTTC CTTAACGAGA TTCCTCTCCT CTGCCTTCAA
 CTTCTCAA **SP6**

Figura S3. Alineamiento de secuencia codificante de *AGL19* con la sonda ARNm *AGL19*.

Identidad 107/108: 99.01%

AGL19	1	ATGGTGAGGGGCAAACGGAGATGAAGAGGATAGAGAACGCAACAAGCAGGCAAGTGACC	60
SONDA	1	-----	0
AGL19	61	TTTTCGAAGAGAAGAAATGGACTCTTGAAGAAAGCCTTCGAATTATCGGTCCCTTGTGAT	120
SONDA	1	-----	0
AGL19	121	GCTGAAGTTGCTTTGGTTATCTTCTCTCCAAGATCCAAACTCTATGAGTTCTCTAGCTCT	180
SONDA	1	-----	0
AGL19	181	AGTATAGCAGCAACAATTGAACGCTATCAGAGACGAATAAAAGAAATTGGGAATAATCAT	240
SONDA	1	-----	0
AGL19	241	AAGAGAAATGATAATTCTCAGCAAGCGAGAGACGAAACATCTGGATTGACAAAAAGATT	300
SONDA	1	-----	0
AGL19	301	GAACAGCTAGAGATATCTAAACGAAAATTGCTTGGAGAAGGCATTGATGCATGTCCATC	360
SONDA	1	-----	0
AGL19	361	GAGGAGCTGCAACAGTTAGAGAATCAGTTGGACCGAAGCTTGAGCAGGATAAGAGCCAAG	420
SONDA	1	-----	0
AGL19	421	AAGTACCAATTACTCCGTGAAGAAATTGAGAAGTTGAAGGCAGAGGAGAGGAATCTCGTT	480
SONDA	1	-----TTGAGAAGTTGAAGGCAGAGGAGAGGAATCTCGTT	35
AGL19	481	AAGGAAAATAAAGATCTGAAGGAGAAGTGGCTTGAATGGGAACAGCAACAATAGCATCA	540
SONDA	36	AAG-AAAATAAAGATCTGAAGGAGAAGTGGCTTGAATGGGAACAGCAACAATAGCATCA	94
AGL19	541	TCACAATCAACGTTATCATCATCAGAAGTGAACATAGATGACAATATGGAAGTGGAGACT	600
SONDA	95	TCACAATCAACGT-----	107
AGL19	601	GGTTTGTTCATTGGACCTCCTGAGACAAGACAATCCAAAAAATCCCTCCTCAAATTA	660
SONDA	108	-----	107

ATGC Dominio MADS, **ATGC** Dominio I, **ATGC** Dominio K, **ATGC** Dominio C-terminal.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión de *TUBULINA2*, *AGL19* y *XAL2/AGL14* por RT-PCR.

Gen	Nombre	Descripción	Secuencia	Condiciones de reacción
TUBULINA2	TUB2 F	Oligo sentido	5' AGG ACT CTC AAA CTC ACT ACC 3'	94°C 2' 94°C 30"
	TUB2 R	Oligo antisentido	5' AAC TGC GGA TGA AGA AGG TGA 3'	62°C 30" 72°C 30" 72°C 5' 25 ciclos
AGL19	AGL19 F NORTH	Oligo sentido	5' TTG AGA AGT TGA AGG CAG A 3'	94°C 2' 94°C 30"
	AGL19 R 430	Oligo antisentido	5' ATT CTT TTT GAA GAA GTT GTA AG 3'	59°C 30" 72°C 30" 72°C 5' 35 ciclos
XAL2/AGL14	AGL14-F458	Oligo sentido	5' GTA GAA AGA TAT CAA AAG CGA A 3'	94°C 2' 94°C 30"
	AGL14-R458	Oligo antisentido	5' GGA GGA AAC TTT TTG AAG TGT 3'	62°C 30" 72°C 30" 72°C 5' 25 ciclos

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para síntesis de ADNc de las sondas sentido y antisentido ARNm *AGL19*.

Gen	Nombre	Descripción	Secuencia	Condiciones
Sonda ARNm AGL19	AGL19 F NORTH	Oligo en sentido	5' TTG AGA AGT TGA AGG CAG A 3'	94°C 2' 94°C 15" 58°C 15" 72°C 15"
	AGL19 R NORHT	Oligo antisentido	5' ACG TTG ATT GTG ATG ATG C 3'	72°C 5' 30 ciclos

Soluciones de Hibridación *in situ* “whole mount”

PBT. Amortiguador PBS y Tween[®] -20

Solución de fijación. Paraformaldehído al 4% en MTSB 1X, 15 %DMSO, 0.1% Tween[®] -20

Solución de hibridación. Formamida 50%, 5X SSC, Tween[®] -20 0.1%, 0.1 mg ml⁻¹ Heparina
10X amortiguador MTSB. 50mM Pipes, 5mM EGTA, 5mM MgSO₄, pH 7.0

10 X amortiguador PBS. 1.3 M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 30 mM NaHPO₄, pH 6.8 con HCl

20X SSC. 3M NaCl, 300 mM Citrato de sodio. pH 7.0 con HCl

Buffer de detección. Tris 0.1M pH 9.5, NaCl 0.1M, MgCl₂ 50mM, Tween[®] -20 0.1%

Solución de Aclaramiento. 4.2 M NaCl, 8 mM Na₂S₂O₃ preparado en glicerol 65% y 2%
DMSO.

12. Referencias

- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, *et al.*, 2004. The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119: 109-20.
- Alvarez-Buylla ER, Corvera-Poiré A, Garay-Arroyo A, García-Ponce B, Jaimes-Miranda F, Pérez-Ruiz RV. 2011. A MADS view of plant development and evolution. *Topics in animal and plant development: from cell differentiation to morphogenesis* Ed. Chimal-Monroy.
- Alvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, Gold SE, Burgeff C, *et al.*, 2000a. MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 24: 457-66.
- Alvarez-Buylla ER, Pelaz S, Liljegren SJ, Gold SE, Burgeff C, *et al.*, 2000b. An ancestral MADS-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 5328-33.
- Bauman E, Lewald J, Saedler H, Schulz B, Wisman E, 1998. Successful PCR-based reverse genetics screens using an En-1 mutagenised *Arabidopsis thaliana* population generate a single-seed descendent. *Theoretical and Applied Genetics*. 97: 729-734.
- Bennett MJ. *et al.*, 1996. *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273: 948-950.
- Bennett T, Scheres B. 2010. Root development-two meristems for the price of one? *Current topics in developmental biology* 91: 67-102.
- Bruno L, Muto A, Spadafora ND, Iaria D, Chiappetta A, *et al.*, 2011. Multi-probe in situ hybridization to whole mount *Arabidopsis* seedlings. *The International journal of developmental biology* 55: 197-203.
- Burgeff C. 2001. Genes MADS-box en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Patrones de expresión in situ y análisis filogenético. *Tesis de Doctorado*. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Burgeff C, Liljegren SJ, Tapia-Lopez R, Yanofsky MF, Alvarez-Buylla ER. 2002. MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* 214: 365-72.
- Childs GV. 2000. In situ hybridization with nonradioactive probes. *In situ Hybridization protocols Methods in molecular biology*. Ed. Darby A. USA. 123: 339.
- Coen ES, Meyerowitz EM. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-7.
- de Almeida Engler J, Van Montagu M, Engler G. 1998. Whole-mount in situ hybridization in plants. *Methods in molecular biology*. USA. 82: 373-384.
- Dubrovsky JG, Soukup A, Napsucialy-Mendivil S, Jeknic Z, Ivanchenko MG. 2009. The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Annals of botany* 103: 807-17.
- Fonseca SS. 2011. Caracterización funcional de *AGL17* en el desarrollo radicular de *Arabidopsis thaliana*. *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas* Universidad Nacional Autónoma de México.
- Friml J, Benkova E, Mayer U, Palme K, Muster G. 2003. Automated whole mount localisation techniques for plant seedlings. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 34: 115-24.
- Gan Y, Filleur S, Rahman A, Gotensparre S, Forde BG. 2005. Nutritional regulation of ANR1 and other root-expressed MADS-box genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 222: 730-42.
- Hayat A.M 2000. *Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications*. London, UK. Cambridge University Press. 423 pp.
- Hejatko J, Blilou I, Brewer PB, Friml J, Scheres B, Benkova E. 2006. In situ hybridization technique for mRNA detection in whole mount *Arabidopsis* samples. *Nature protocols* 1: 1939-46.
- Kaufmann K, Melzer R, Theissen G. 2005. MIKC-type MADS-domain proteins: structural modularity, protein interactions and network evolution in land plants. *Gene* 347: 183-98.

- Koornneef M, Alonso-Blanco C, Vreugdenhil D. 2004. Naturally occurring genetic variation in *Arabidopsis thaliana*. *Annual review of plant biology* 55: 141-72.
- Ludevid D, Hofte H, Himelblau E, Chrispeels MJ. 1992. The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein gamma-TIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement. *Plant Physiology*. 100: 1633–1639.
- Martinez-Castilla LP, Alvarez-Buylla ER. 2003. Adaptive evolution in the *Arabidopsis* MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 13407-12.
- McFadden IG. 1995. In situ hybridization. *Methods in cell Biology*. Ed. DW Galbraith, Bourque D. P., Bohnert H. J. Academic Pres. pp. 183.
- Messenguy F, Dubois E. 2003. Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* 316: 1-21.
- Morel GC, A. & Williams, L. 2001. *In situ hybridization in electron microscopy*. USA. 455 pp.
- Nam J, Kim J, Lee S, An G, Ma H, Nei M. 2004. Type I MADS-box genes have experienced faster birth-and-death evolution than type II MADS-box genes in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 1910-5.
- Ochoa-Espinosa A. 2002. Análisis funcional preliminar de *AGL19*, un gen MADS-box específico de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Tesis de Licenciatura en Biología*. Universidad Autónoma de México.
- Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E, Varotto S, Ciaffi M. 2007. Molecular and phylogenetic analysis of MADS-box genes of MIKC type and chromosome location of SEP-like genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular genetics and genomics* : MGG 278: 689-708.
- Parenicova L, de Folter S, Kieffer M, Horner DS, Favalli C, et al., 2003. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *The Plant cell* 15: 1538-51.
- Rounsley SD, Ditta GS, Yanofsky MF. 1995. Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *The Plant cell* 7: 1259-69.

- Schonrock N, Bouveret R, Leroy O, Borghi L, Kohler C, *et al.*, 2006. Polycomb-group proteins repress the floral activator *AGL19* in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes & development* 20: 1667-78.
- Shore P, Sharrocks AD. 1995. The MADS-box family of transcription factors. *European journal of biochemistry / FEBS* 229: 1-13.
- Szechynska-Hebda M, Wedzony M, Dubas E, Kieft H, van Lammeren A. 2006. Visualization of microtubules and actin filaments in fixed BY-2 suspension cells using an optimised whole mount immunolabelling protocol. *Plant cell reports* 25: 758-66.
- Taiz L, Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*. Massachusetts, USA: Sinauer Associates. 764 pp.
- Tapia-Lopez R, Garcia-Ponce B, Dubrovsky JG, Garay-Arroyo A, Perez-Ruiz RV, *et al.*, 2008. An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (*AGL12*), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 146: 1182-92
- Tautz D, Pfeifle C. 1989. A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98: 81-5
- Theissen G, Becker A, Di Rosa A, Kanno A, Kim JT, *et al.*, 2000. A short history of MADS-box genes in plants. *Plant molecular biology* 42: 115-49
- van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B. 1997. Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390: 287-9
- Villajuana M. 2006. Papel funcional de los genes MADS-box tipo SOC1, (*AGL19* y *AGL14*) en las vías de la regulación de la transición a la floración. *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wilkinson DG. 1998. *In situ hybridization. A practical approach*. London, UK: Oxford University Press. . 224 pp

